

**Efectos de la competencia entre plantas vecinas sobre la vía de
señalización de los jasmonatos en plantas de *Arabidopsis thaliana***

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Ignacio Cerrudo

Lic. En Ciencias Biológicas - Universidad Nacional de Mar del Plata- 2010

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la
Agricultura (IFEVA). Facultad de Agronomía-UBA-CONICET



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano



Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Carlos L. Ballaré

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Oregon State University, U.S.A)

Consejero de Estudios

Miriam M. Izaguirre

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Carlos L. Ballaré

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Oregon State University, U.S.A)

JURADO

Paula Casati

Licenciada en Biotecnología (Universidad Nacional de Rosario)

Doctor (Universidad Nacional de Rosario)

JURADO

Jorge Prometeo Muschietti

Licenciado en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Fernando Pieckenstain

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 13 de Marzo de 2015

AGRADECIMIENTOS

-A la educación pública y al CONICET por permitirme estudiar y desarrollar este doctorado

-Al IFEVA por haberme otorgado un lugar para el desarrollo de este trabajo y por permitirme formar parte de este grupo.

Asimismo quiero agradecer en particular:

-Al Dr. Carlos Ballaré por haber confiado en mí y aceptado ser director de este trabajo. Por haberme introducido en el mundo de la fotobiología. Por el tiempo y esfuerzo que dedicó que para que se pueda concretar.

-A la Dra Miriam Izaguirre y al Dr Carlos Mazza por haberme ayudado en mis comienzos en el laboratorio como en estas últimas etapas.

-A todos los del grupo UV (Mel, Pato, Mer K, Miriam y Flor) por todas las cosas que hemos pasado, charlas, mates y discusiones.

-A los vecinos del laboratorio (Vero, Rena, Nati y Cristian) por toda la ayuda que me dieron y por todo lo que me prestaron y me siguen prestando, al igual que los chicos del laboratorio Grande.

-A Mel, por tantos mates cebados, por la ayuda en los experimentos, tanto en las discusiones como en la ayuda en las correcciones de esta tesis.

-En fin a todos los miembros del IFEVA que me ayudaron que durante estos 5 años de trabajo.

-A mi viejo y mi hermano Diego por la ayuda en las correcciones de la tesis.

-A mis viejos, hermanos y amigos por apoyarme y bancarme siempre.

-Y sobre todo a Naty por haberme bancado y estar siempre a mi lado.

Muchas gracias a todos!!!

Efectos de la competencia entre plantas vecinas sobre la vía de señalización de los jasmonatos en plantas de *Arabidopsis thaliana*

RESUMEN

La competencia y la herbivoría son dos fuerzas selectivas en la evolución de las plantas terrestres. Éstas deben crecer lo suficientemente rápido como para ser competitivas con sus vecinos y, al mismo tiempo, asignar recursos a las defensas para poder sobrevivir a los organismos consumidores. Estudios recientes mostraron que las señales lumínicas asociadas a la competencia, p. ej. una baja relación rojo:rojo lejano (R:RL) produce la represión del sistema de defensas, tornando a las plantas más susceptibles al ataque de insectos herbívoros y microorganismos patógenos.

En este trabajo de tesis doctoral se pretende avanzar en el entendimiento de los mecanismos que median los efectos de cambios en el ambiente lumínico asociados a la competencia sobre la vía de señalización de los jasmonatos (JAs). Se postulan y descartan posibles mecanismos mediante los cuales la inactivación del fitocromo B (phyB) por bajas relaciones R:RL produce la represión de la vía de los JAs. Los estudios se realizaron en plantas de *Arabidopsis thaliana* en los cuales se evaluó la expresión génica y la producción de diversos componentes de la respuesta de defensa de los JAs, así como la resistencia al patógeno necrótrofo *Botrytis cinerea*.

Los resultados presentados en esta tesis están entre los primeros en demostrar que la simulación de competencia por bajas relaciones R:RL produce un aumento en la susceptibilidad a la infección del hongo *B. cinerea*, y que este efecto del RL está relacionado con una represión de la vía de señalización del JA. El efecto del RL ocurre a nivel del módulo SCF^{COII}-JAZ de percepción de JA-Ile. Los resultados también sugieren que la variante de *splicing* JAZ10.4 es necesaria y suficiente para que la radiación RL aumente la susceptibilidad a la infección de *B. cinerea*, y que la represión de la vía del JA se encuentra regulada a un nivel post-transcripcional que involucra a la deacetilasa de histona RPD3 tipo 6 (HDA6). También se demuestra que en ésta represión no participan elementos de la vía de señalización del ácido salicílico (SA), antagonica a la vía de los JAs, y que, para varios de los marcadores analizados, las proteínas DELLA (represoras de la vía de señalización de las giberelinas (GA)) no jugarían un papel importante en la regulación del efecto del RL.

Palabras clave: relación rojo: rojo lejano, defensas inducibles, jasmonatos, JAZ, ácido salicílico, cromatina, HDA6, *Botrytis cinerea*.

Effects of competition among neighboring plants on jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

Competition and herbivory are two selective forces in the evolution of plants. Plants have to grow fast enough to be competitive with their neighbors and, at the same time, allocate resources to defenses to survive in environments where consumer organisms are present. Recent studies showed that the light signals associated with competition, (low red:far-red ratios (R: FR)) act as negative regulators of plant immunity, rendering the plants more susceptible to herbivorous insects and pathogen attack.

This doctoral thesis aims to advance our understanding of the mechanisms that mediate the effects of changes in the light environment associated with competition on jasmonate (JA) signaling pathway. We postulate and discard possible mechanisms by which the inactivation of the phytochrome B (phyB) by low R:FR ratios produces a repression in the JA pathway. Studies were performed using *Arabidopsis thaliana* plants. We characterized several markers of the JA response (gene expression and production of various secondary compounds) as well as plant resistance to the necrotroph pathogen *Botrytis cinerea*.

The results presented in this thesis are among the first to demonstrate that the simulation of competition by low R:FR ratios results in increased susceptibility to infection by *B. cinerea*, and that this effect of FR is associated with repression of the JA signaling pathway. The effect of FR occurs at the level of the SCF^{COII}-JAZ module of JA-Ile perception. The results also suggest that the JAZ10.4 variant of alternative splicing of *JAZ10* is necessary and sufficient for the FR-induced increase in the susceptibility to infection by *B. cinerea*, and that the FR-induced repression of JA signaling may be regulated at the post-transcriptional level by the histone deacetylase RPD3 type 6 (HDA6). We also demonstrate that the salicylic acid (SA) pathway, antagonistic to the JAs pathway, is not involved in this repression and that, for several markers of the JA response, DELLA proteins (which are repressors of gibberellin signaling) are not involved in the FR effect repressing JA signaling.

keywords: red: far red ratios, inducible defenses, jasmonates, JAZ, salicylic acid, chromatin, HDA6, *Botrytis cinerea*.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

PUBLICACIONES

Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, Demkura PV, de Wit M, Patitucci MS, Pierik R, Pieterse CMJ, Ballaré CL (2012) Low red/far-red ratios reduce arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea* and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiology* **158**: 2042-2052

Leone M, Keller M, **Cerrudo I**, Ballaré CL (2014) To grow or defend? Low red:far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in *Arabidopsis* seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytologist*. **doi: 10.1111/nph.12971**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Señales externas que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas.....	4
Figura 1.2: Distribución espectral de fotones de la radiación solar y de la radiación bajo un canopeo.....	5
Figura 1.3: Luz absorbida, reflejada y transmitida por las tejidos fotosintéticos.....	6
Figura 1.4: Equilibrio del fitocromo.....	8
Figura 1.5: Esquema metabólico de la ruta biosintética de las oxilipinas incluyendo las ramas de la 9- y 13-lipoxigenasas (9-LOX y 13-LOX) y biosíntesis de los JAs.....	14
Figura 1.6: Esquema de las proteínas JAZ en <i>A. thaliana</i>	16
Figura 1.7: Modelo actual de percepción de JA y activación de genes de respuesta....	19
Figura 1.8: Esquema conceptual de las conexiones potenciales entre el phyB y la señalización de los JAs en la modulación de defensas en respuesta a la proximidad de plantas vecinas.....	25
Figura 2.1: Fotos de plantas utilizadas.....	33
Figura 2.2: Esquema del protocolo utilizado para la simulación de plantas vecinas, aplicando RL en forma lateral.....	34
Figura 2.3: Fotografías de bioensayo con <i>B. cinerea</i>	36
Figura 2.4: Clasificación de las lesiones de <i>B. cinerea</i> según la severidad del daño....	37
Figura 3.1: Modelo simplificado de las principales vías de señalización (ET; JA; SA) implicadas en las respuestas a estreses bióticos en <i>Arabidopsis</i>	48
Figura 3.2: La inactivación del fitocromo por el tratamiento con radiación RL reduce la expresión de genes marcadores de la respuesta a los JAs.....	51
Figura 3.3: La inactivación del fitocromo por radiación RL reduce la acumulación de compuestos fenólicos solubles y antocianas en hojas.....	52
Figura 3.4: La inactivación del fitocromo por el tratamiento con radiación RL reduce la resistencia de plantas de <i>A. thaliana</i> a la infección por <i>B. cinerea</i>	52
Figura 3.5: Los efectos del RL reduciendo la expresión del gen <i>PDF1.2</i> se encuentran conservados en las mutantes de la vía del SA, <i>sid2-1</i>	54
Figura 3.6: Los efectos del RL reduciendo la acumulación de compuestos fenólicos solubles y antocianas se encuentran conservados en las mutantes <i>sid2-1</i> y <i>npr1-1</i> de la vía del SA.....	55

Figure 3.7: El efecto de la inactivación del phyB por radiación RL sobre la resistencia de plantas de <i>A. thaliana</i> a la infección por <i>B. cinerea</i> es independiente de la vía de señalización del SA.....	56
Figura 3.8: La represión en la expresión de <i>PDF1.2</i> producida por bajas relaciones R:RL requiere de COI1.....	57
Figura 3.9: JAZ10 es necesario para que la inactivación del phyB por radiación RL produzca una disminución en la resistencia de <i>A. thaliana</i> a la infección por <i>B. cinerea</i>	58
Figura 3.10: La variante de <i>splicing</i> de JAZ10, JAZ10.4 participa en la disminución en la resistencia de <i>A. thaliana</i> a la infección por <i>B. cinerea</i> producida por la inactivación del phyB por RL.....	60
Figura 4.1: Modelo que explica el conflicto entre la defensa y el crecimiento basado en la interacción antagónica entre vías de señalización de las GA y el JA.....	69
Figura 4.2: Los efectos del RL reduciendo la acumulación de antocianas.....	71
Figura 4.3: Efecto de la inactivación del phyB por radiación RL en la resistencia de plantas de <i>A. thaliana</i> a la infección por <i>B. cinerea</i>	71
Figura 4.4: El efecto del RL reduciendo la acumulación de antocianas se encuentra conservado en mutantes <i>della</i> (<i>4xdella</i> y <i>5xdella</i>).....	72
Figura 4.5: El efecto del RL reduciendo la acumulación compuestos fenólicos solubles se encuentra conservado en mutantes <i>della</i> (<i>5xdella</i>).....	73
Figura 4.6: Efecto de la inactivación del phyB por radiación RL en la resistencia de mutantes <i>4xdella</i> a la infección por <i>B. cinerea</i>	73
Figura 4.7: Los efectos del RL reduciendo la acumulación compuestos fenólicos solubles y antocianas se encuentran conservadas en mutantes <i>della</i> (<i>gai-1</i>).....	75
Figura 4.8: Efecto de la inactivación del phyB por radiación RL en la resistencia de mutantes <i>gai-1</i> a la infección por <i>B. cinerea</i>	76
Figura 5.1: Posibles mecanismos que subyacen a la represión transcripcional mediada por las proteínas JAZ.....	83
Figura 5.2: La inhibición de las HDAs con Trichostatin A (TSA) aumenta la expresión del gen <i>ERF1</i> y reprime la regulación negativa de la expresión de este gen en respuesta a bajas relaciones R:RL.....	84
Figura 5.3: La inhibición de las HDAs con Trichostatin A (TSA) aumenta la expresión del gen <i>PDF1.2</i> y reprime la regulación negativa de la expresión de este gen en respuesta a bajas relaciones R:RL.....	85

Figura 5.4: La sensibilización a la infección de <i>B. cinerea</i> producida por bajas relaciones R:RL requiere de HDA6 funcional.....	85
Figura 5.5: La HDA6 es necesaria para que las bajas relaciones R:RL reduzcan la acumulación antocianinas en hojas producida por la percepción de MeJA.....	86
Figura 6.1: Modelo propuesto de la represión de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL.....	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1: Listado de líneas de <i>A. thaliana</i> utilizadas.....	32
Cuadro 2.2: Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para PCR.....	41

ABREVIATURAS

B	Radiación azul
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
ET	Etileno
ETI	Inmunidad disparada por efectores
FACs	Ácidos grasos conjugados a aminoácidos
FT	Factor de transcripción
GA	Giberelinas
HAMPs	Patrones moleculares asociados a herbívoros
HDAs	Deacetilasa de histonas
HDA6	Deacetilasa de histonas RPD3 tipo 6
ISR	Resistencia sistémica inducida
JA	Ácido jasmónico
JAs	Jasmonatos
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microbios
MS	Medio Murashige Skoog
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
phyB	Fitocromo B
phys	Fitocromos
PTI	Respuesta inmune por PAMPs
R	Radiación roja
RL	Radiación roja lejana
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SAS	Síndrome de escape al sombreado
TSA	Trichostatin A
UV	Radiación ultra violeta

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
DECLARACIÓN.....	IV
PUBLICACIONES.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
ÍNDICE.....	XI
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1-1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1-2 La radiación solar.....	4
1-3 Percepción del ambiente lumínico.....	6
1-4 Respuesta inmune de las plantas.....	9
1-5 Reconocimiento del atacante.....	10
1-6 Resistencia sistémica adquirida e inducida.....	11
1-7 Fitohormonas.....	12
1-7-1 El ácido jasmónico.....	13
1-7-1-1 Biosíntesis del JA.....	13
1-7-1-2 Represores de la vía de los JAs.....	15
1-7-1-2-1 Las proteínas JAZ.....	15
1-7-1-2-2 Co-represores reclutados por las proteínas JAZ...	16
1-7-1-3 Percepción de los jasmonatos.....	17
1-7-2 El Acido Salicílico.....	20
1-7-3 El etileno.....	21
1-7-4 Las giberelinas.....	22
1-8 El dilema de las plantas.....	23
1-9 OBJETIVOS e HIPÓTESIS de TRABAJO.....	26
CAPÍTULO 2 Materiales y métodos.....	29
2-1 Materiales.....	31

2-1-1 Líneas utilizadas.....	31
2-1-2 Germinación de semillas de <i>A. thaliana</i>	31
2-1-3 Cepa de <i>B. cinerea</i>	31
2-2 Métodos.....	33
2-2-1 Simulación de presencia de plantas vecinas: tratamiento con RL.....	33
2-2-2 Tratamiento de herbivoría simulada con la aplicación de MeJA exógeno.....	34
2-2-3 Tratamiento con inhibidores de deacetilasas de histonas, Trichostatin A (TSA).....	35
2-2-4 Bioensayos con <i>B. cinerea</i>	35
2-2-5 Medición de expresión de genes vinculados a la defensa.....	36
2-2-6 Detección y medición de metabolitos secundarios (fenólicos solubles y antocianinas).....	37
2-2-7 Extracción de ARN.....	37
2-2-8 Extracción de ADN.....	38
2-2-9 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	38
2-2-10 Tratamiento con ADNs del ARN.....	39
2-2-11 Síntesis de ADNc (Transcripción reversa).....	39
2-2-12 Cuantificación de la expresión génica.....	39
2-2-12-1 PCR en tiempo real (RTq-PCR).....	39
2-2-12-2 PCRs semicuantitativas.....	40
2-2-13 Secuenciación de ADN genómico.....	40
2-2-14 Diseño de anticuerpo anti JAZ10.....	41
2-2-15 Extracción de proteínas totales.....	42
2-2-16 Cuantificación de proteínas totales.....	42
2-2-17 Técnica de Western blot.....	42
2-2-17 Análisis estadísticos.....	43

CAPÍTULO 3 El <i>crosstalk</i> entre JA-SA y el efecto de las variantes de <i>splicing</i> de las proteínas represoras JAZ10 sobre la regulación negativa de la vía de los tejidos a JA por bajas relaciones R:RL.....	45
3-1 INTRODUCCIÓN.....	47
3-2 RESULTADOS.....	50

3-2-1 Las bajas relaciones R:RL reprimen la inducción de defensas mediadas por la vía de señalización de los JAs.....	50
3-2-2 La represión a la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL es independiente de la vía del SA.....	53
3-2-3 Las bajas relaciones R:RL reprimen la vía de los JAs a nivel del módulo de percepción del JA por el complejo proteico SCF ^{COI1} -JAZ.....	55
3-2-4 La proteína JAZ10 es requerida para la sensibilización de <i>A. thaliana</i> frente a <i>B. cinerea</i> causada por bajas relaciones R:RL.....	57
3-3 DISCUSIÓN.....	59
3-3-1 La proximidad de plantas vecinas reprime las respuestas de defensas mediadas por los JAs a través de la inactivación de phyB.....	60
3-3-2 La atenuación de las respuesta a los JAs por señales de competencia es independiente de la vía del SA.....	62
3-3-3 La regulación negativa de la vía de los JAs por RL y por el SA se produce a distintos niveles.....	63
3-3-4 La proteína JAZ10 participa de la regulación negativa de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL.....	63
3-4 CONCLUSIONES.....	64
 CAPÍTULO 4 El <i>crosstalk</i> entre JA-GA no participa en la represión de las respuestas a JA producida por bajas relaciones R:RL.....	65
4-1 INTRODUCCION.....	67
4-2 RESULTADOS.....	70
4-2-1 Los ecotipos salvajes Ler y Col-0 responden de manera similar en cuanto a la desensibilización de la respuesta a los JAs ocasionada por bajas relaciones R:RL.....	70
4-2-2 El efecto de bajas relaciones R:RL se encuentra conservado en mutantes <i>dellas</i>	70
4-2-3 El efecto de bajas relaciones R:RL se encuentra conservado en plantas mutantes con <i>della</i> estables (<i>gai-1</i>).....	74
4-3 DISCUSIÓN.....	76
4-4 CONCLUSIONES.....	77

CAPÍTULO 5 La estructura de la cromatina participa en la represión de la respuesta a JA por bajas relaciones R:RL.....	79
5-1 INTRODUCCIÓN.....	81
5-2 RESULTADOS.....	83
5-2-1 Las HDAs participan en la regulación negativa de la expresión de genes de la vía de los JA producida por bajas relaciones R:RL.....	83
5-2-2 Las mutaciones de HDA6 hacen a <i>A. thaliana</i> más resistente al ataque de <i>B. cinerea</i> e insensible a bajas relaciones R:RL.....	84
5-2-3 La mutaciones de HDA6 impiden la represión por las bajas relaciones R:RL de la acumulación de metabolitos secundarios dependientes de los JAs.....	86
5-3 DISCUSIÓN.....	86
5-4 CONCLUSIONES.....	87
 CAPÍTULO 6 Conclusión general.....	 89
 CAPÍTULO 7 Bibliografía.....	 97

CAPÍTULO 1

Introducción general, objetivos e hipótesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los ecosistemas son altamente heterogéneos tanto en tiempo como en espacio, razón por la cual los organismos deben adaptarse o escapar cuando se presentan condiciones que les son desfavorables. Las plantas se encuentran continuamente expuestas a cambios ambientales a lo largo de su ciclo de vida y, al ser organismos inmóviles deben estar preparadas para afrontar las variaciones del medio ambiente. Estos organismos sésiles están capacitados para expresar distintos fenotipos, lo que les permite adaptarse a los cambios dentro de los ecosistemas (Sultan, 2000).

Para poder adaptarse a estos cambios ambientales las plantas han adquirido evolutivamente la capacidad de detectar variaciones en su entorno físico, químico y biológico. Además, perciben señales que contienen información, las cuales son utilizadas para ajustar su crecimiento y morfología. A lo largo de su ciclo se enfrentan a una amplia gama de señales externas (estímulos) como por ejemplo: la luz, los nutrientes minerales, los metabolitos orgánicos, la gravedad, el contenido de agua, la presión de turgencia, la calidad del suelo, el viento, cambios de temperatura, heladas, los reguladores de crecimiento y hormonas, el pH del suelo, la interacción con las paredes celulares de células anexas, señales eléctricas, gases (CO₂, O₂, C₂H₄), daños y enfermedades (Gilroy y Trewavas, 2001) (Figura 1.1). El presente análisis se centrará en la incidencia de la luz y en las enfermedades.

1-1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta pequeña que se utiliza ampliamente como un organismo modelo en biología vegetal. *Arabidopsis* es una angiosperma, dicotiledónea perteneciente a la familia de las *Brassicaceae*. A pesar de no poseer importancia agronómica ofrece importantes ventajas para la investigación básica en genética y biología molecular. Entre algunas de sus ventajas se encuentra 1) la de poseer uno de los genomas más pequeños del reino vegetal completamente secuenciado, 2) su ciclo de vida es relativamente corto (6 semanas aproximadamente), 3) se cultiva fácilmente en ambientes reducidos como cámaras de cultivo con luz artificial y 4) existe un gran número de líneas mutantes y recursos genómicos y moleculares disponibles.

Estas ventajas han hecho que *Arabidopsis* se utilice como modelo en la gran mayoría de los estudios de biología molecular vegetal.

1-2 La radiación solar

Se conoce por radiación solar al conjunto de radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol. Las mismas son ondas producidas por la oscilación o aceleración de una carga eléctrica. Éstas pueden tener diferentes longitudes de onda y en su conjunto todas las longitudes de onda se denominan espectro electromagnético. Las longitudes de onda entre 100 y 399 nm son conocidas como ultravioleta (UV), entre 400 y 700 nm como visible y entre 700 y 800 nm como RL (Figura 1.2). Las radiaciones más potentes presentan las mayores frecuencias y las menores longitudes de onda, mientras que las más débiles se caracterizan por sus bajas frecuencias y amplias longitudes de onda.

Tanto las radiaciones UV como las RL no son visibles para el ojo humano mientras que las plantas son capaces de percibir estas longitudes de onda.

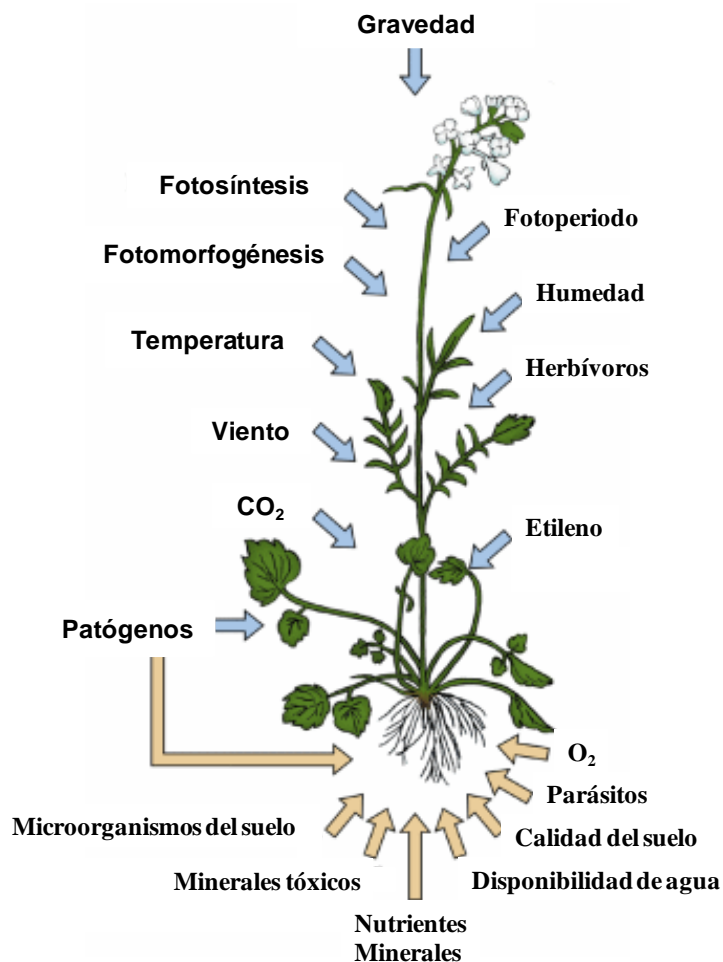


Figura 1.1: Señales externas que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Flechas amarillas indican señales percibidas por la raíz; flechas celestes indican señales percibidas por el tallo, hojas y flores. Tomado de <http://fisiolvegetal.blogspot.com.ar/2012/10/senalizacion-y-transduccion-de-senales.html>.

Del total de la radiación solar que incide en una planta, solo la porción que se encuentra entre los 400 a 700 nm es utilizada para la fotosíntesis (Figura 1.3). Esta radiación es la denominada radiación fotosintéticamente activa (PAR, *Photosynthetically Active Radiation*) y constituye aproximadamente el 50% del total de la radiación solar incidente.

Los organismos fotosintéticos son capaces de transformar la energía lumínica en energía química estable, la cual puede llegar a durar hasta cientos de millones de años como por ejemplo en los combustibles fósiles. Durante el proceso de fotosíntesis la energía es absorbida por las clorofilas y los carotenoides para luego de numerosos pasos transformarla en energía química. Estos pigmentos absorben fuertemente en las regiones del azul y del rojo (R); el resto de la radiación se refleja y/o transmite a través de la hoja. Entre las longitudes de onda reflejadas o transmitidas se encuentran las correspondientes al RL, esto hace que se establezca una baja relación R:RL (Figura 1.3) en comparación con la de la luz solar, cuya relación es de aproximadamente 1,2 (Smith, 1995) (Figura 1.2).

Conforme a lo expresado precedentemente la radiación es utilizada por las plantas como una fuente de energía, pero además es utilizada como una fuente de información del ambiente que las rodea.

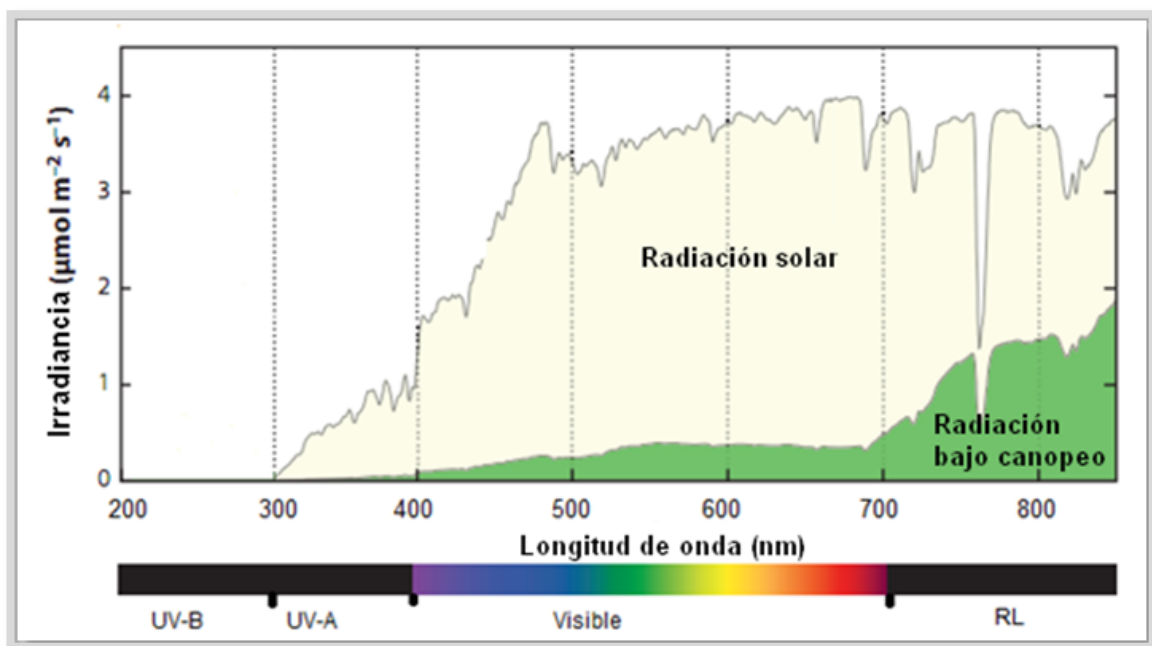


Figura 1.2: Distribución espectral de fotones de la radiación solar y de la radiación bajo un canopy. Se puede observar que bajo canopy aumenta la proporción de las longitudes de onda RL. Editado de Casal (2013).

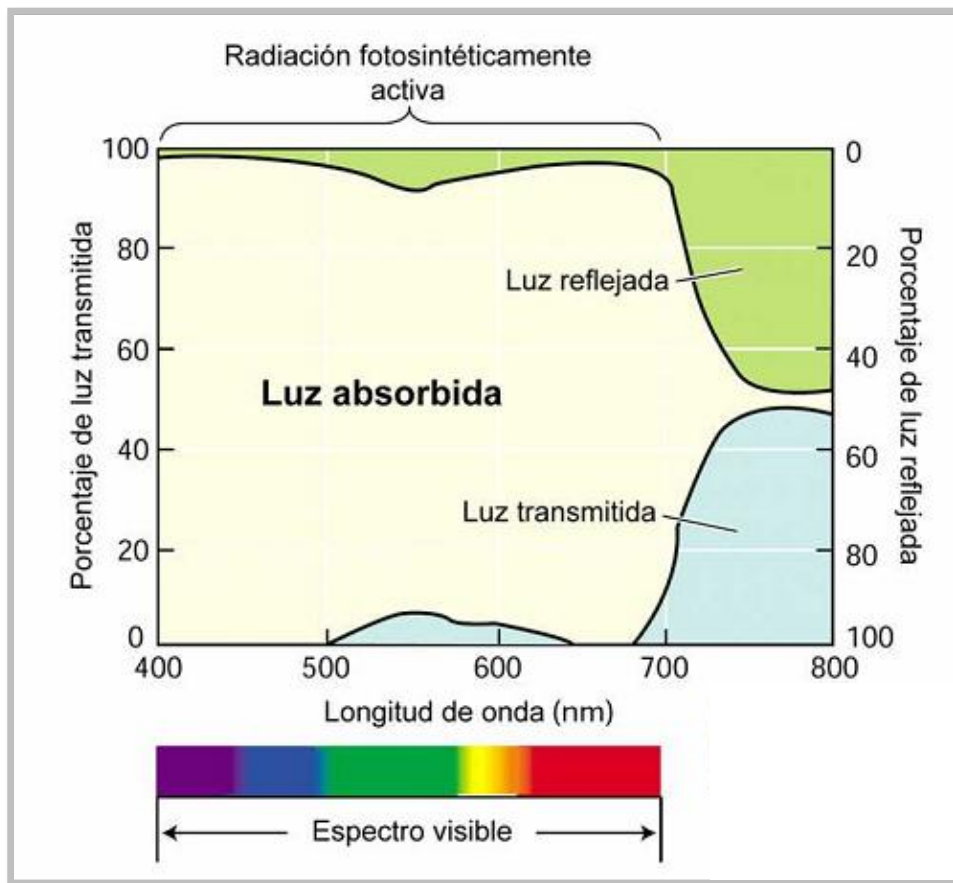


Figura 1.3: Luz absorbida, reflejada y transmitida por las tejidos fotosintéticos. En amarillo se puede observar la luz absorbida por las hojas, en verde la luz reflejada y en celeste la luz transmitida. La mayor parte de las radiaciones del espectro visible son absorbidas mientras que la radiación RL (700-800nm) es reflejada y transmitida. Tomado de Taiz y Zeiger (2002).

1-3 Percepción del ambiente lumínico

Las plantas crecen en ambientes donde es muy frecuente que exista competencia por recursos limitantes (radiación, agua y nutrientes entre otros). Es por esto que las plantas expresan respuestas adaptativas para maximizar la captura de esos recursos (Ballaré, 2009; Keuskamp et al., 2010; Ballaré, 2011). A lo largo de la evolución se han seleccionado mecanismos que les permitieron evitar o minimizar el sombreado producido por plantas vecinas, logrando así evadir las zonas donde la calidad lumínica es inferior (Figura 1.1). Entre estos mecanismos se encuentran los de respuesta a la competencia sobre los cuales existe abundante información que demuestra que la luz es una de las fuentes principales utilizadas por las plantas para percibir la proximidad de otras plantas (Ballaré, 1999; Smith, 2000; Ballaré, 2009). Esta percepción de cambios lumínicos se lleva a cabo por un conjunto de fotorreceptores que operan en diferentes longitudes de onda. Entre ellos se encuentran los fitocromos (phys) que tienen máxima

sensibilidad en las regiones del R (660 nm) y el RL (730 nm) (Franklin, 2008), las fototropinas y criptocromos que tienen un papel preponderante en la percepción de la luz azul (400-500 nm) y la radiación ultravioleta A (UV-A, 315-400 nm) (Briggs y Christie, 2002). La percepción de la radiación ultravioleta-B (UV-B, 280-315 nm) es llevada a cabo por la proteína UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8) (Rizzini et al., 2011). Es importante resaltar que no solo la intensidad de la luz, sino que también la calidad, dirección y la duración del día condicionan notablemente el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Es por esto que las plantas han desarrollado respuestas adaptativas a la luz entre las que se destacan el fototropismo, el escape al sombreado, la sincronización de los ritmos circadianos y la floración.

Los phys se encuentran codificados por una pequeña familia multigénica, en *A. thaliana* se compone de cinco genes (*PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* y *PHYE*) (Clack et al., 1994; Mathews and Sharrock, 1997). Estos fotorreceptores están formados por dos componentes una proteína (PHY), sintetizada en el citosol, y un cromóforo de estructura tetrapirrol de cadena abierta (fitocromobilina) sintetizado en cloroplastos. Su biosíntesis involucra la convergencia de dos vías que culminan en el ensamble de la holoproteína (phy) activable por la luz (Tu and Lagarias, 2005). Todos los phys se encuentran como dímeros, compuestos por dos polipéptidos de 125-kDa, que se presentan en dos conformaciones interconvertibles. La conformación Pr absorbe principalmente luz R y la conformación Pfr absorbe luz RL. Durante la fotoconversión del cromóforo se produce un cambio en la estructura de la proteína (Rockwell and Lagarias, 2006) y en la localización intracelular, cuando la cromoproteína absorbe luz R es fotoconvertida de la forma Pr (inactiva) a la forma Pfr (activa). La forma Pfr se puede convertir a la forma Pr por la absorción de RL o de una manera independiente de la luz (reversión en oscuridad) (Figura 1.4). Los espectros de absorción de la forma Pfr y Pr se solapan parcialmente, estableciéndose así un equilibrio. La cantidad de Pfr en relación a la cantidad total de fitocromo (Pfr:Ptotal) dependerá de la composición espectral de la luz. En condiciones de altas relaciones R:RL el phy reside en el núcleo predominantemente en su forma activa (Pfr), cuando esta relación R:RL es baja el phy es parcialmente inactivado y en su forma inactiva Pr migra al citoplasma (Smith, 1995).

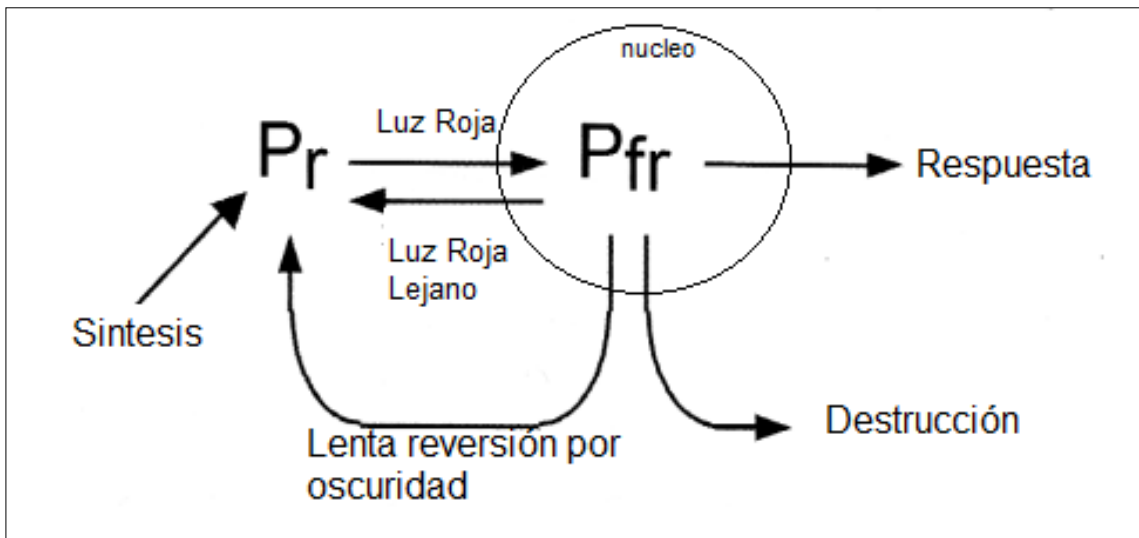


Figura 1.4: Equilibrio del fitocromo. En presencia de luz roja (660nm) el fitocromo se encuentra en su forma activa Pfr en el núcleo. Cuando perciben luz roja lejana (730nm), se inactiva (Pr) y sale del núcleo. En ausencia de luz, Pfr se inactiva.

El principal fotorreceptor utilizado por las plantas para detectar la proximidad de sus vecinas es el fitocromo B (phyB) (Ballaré, 2009; Keuskamp et al., 2010). Como ya se mencionó, la relación R:RL de la radiación solar directa es de 1,2, mientras que esta disminuye dentro del canopy a medida que aumenta la densidad de plantas; es así que bajo radiación solar directa puede establecerse un fotoequilibrio de 60 % Pfr:Ptotal mientras que bajo un canopy denso el fotoequilibrio puede llegar a niveles del 0,1 % Pfr:Ptotal (Smith, 2000). De este modo la percepción de la calidad lumínica les provee información acerca de sus plantas vecinas que como posibles competidoras podrían poner en peligro su supervivencia. Con esta información elaboran un conjunto de respuestas conocidas como síndrome de escape al sombreado (SAS), generando un crecimiento hacia las zonas donde las relaciones R:RL sean mayores y así evitar ser sombreadas (Schmitt et al., 2003; Ballaré, 2009; Franklin and Quail, 2010; Kami et al., 2010; Keuskamp et al., 2010). El SAS se caracteriza por el alargamiento rápido de tallos y pecíolos, adelanto de la floración, hojas hiponásticas, reducción de la ramificación y crecimiento de los tallos hacia los claros del canopy (Ballaré et al., 1990; Ballaré, 2009; Kami et al., 2010; Casal, 2013). Queda claro entonces que las bajas relaciones R:RL sirven como una señal para detectar la presencia de plantas vecinas preparando a las plantas para una posible competencia futura.

1-4 Respuesta inmune de las plantas

En su ambiente natural las plantas enfrentan riesgos de ser atacadas por una gran variedad de parásitos, incluyendo virus, bacterias, hongos, oomicetos, nematodos, así como por insectos e incluso por otras plantas. En la gran mayoría de los ecosistemas terrestres los insectos fitófagos representan una de las principales amenazas y constituyen el nexo central entre los productores primarios y los siguientes niveles tróficos (Schoonhoven et al., 2005). Sin embargo, de la gran cantidad de especies de herbívoros presentes en un ecosistema sólo una pequeña fracción es capaz de alimentarse de una especie vegetal dada. Para hacer frente a sus enemigos, las plantas poseen sistemas de defensa de elevada sofisticación, que reflejan a la respuesta inmune de los animales. Estos mecanismos de defensa reconocen señales del daño a sus propias células como asimismo moléculas no propias. Este reconocimiento genera una activación de una respuesta inmune eficaz contra el organismo invasor (Jones and Dangl, 2006; Pieterse et al., 2009; Pieterse et al., 2012; Spoel and Dong, 2012; Ballaré, 2014). Esta capacidad les permite a las plantas sobrevivir a pesar de los numerosos organismos herbívoros y patógenos presentes en los ecosistemas.

Los sistemas de defensas generados por las plantas contra los organismos patógenos y consumidores se manifiestan mediante una combinación de defensas directas e indirectas. Las directas son dirigidas hacia el atacante y su acción se basa en el despliegue de compuestos químicos secundarios o enzimas que actúan como toxinas que impiden o interfieren con el metabolismo del organismo invasor (Howe and Jander, 2008; Dicke and Baldwin, 2010; Wu and Baldwin, 2010). Por su parte, las defensas indirectas, altamente eficaces contra los herbívoros, se basan en la producción de metabolitos o estructuras que atraen a los enemigos naturales de sus atacantes, tales como: mezclas específicas de compuestos volátiles o néctar extrafloral (Karban and Baldwin, 1997; Keinänen et al., 2001; Schoonhoven et al., 2005). Ambas defensas pueden ser inducibles, es decir que se activan en respuesta al ataque de un patógeno o de un herbívoro, asimismo son de gran importancia en la aclimatación de las plantas frente a los cambios producidos en el ambiente en que se encuentran (Karban, 2008; Metlen et al., 2009).

Los patógenos de plantas se dividen generalmente en necrótrofos y biótrofos (Glazebrook 2005). Los patógenos necrótrofos actúan primero destruyendo las células del huésped a menudo a través de la producción de fitotoxinas y enzimas que degradan la pared celular para luego alimentarse de los contenidos celulares. Por su parte, los

biótrofos se alimentan de los tejidos del huésped vivo causando un daño mínimo a las células huésped, comúnmente a través de estructuras de alimentación especializadas. Existen otros patógenos que muestran ambos estilos de vida, dependiendo de la etapa del ciclo de vida en la que se encuentran y se los conoce como patógenos hemibiótrofos.

1-5 Reconocimiento del atacante

Las plantas han desarrollado evolutivamente sofisticados mecanismos para detectar y resistir el ataque de organismos invasores, además han adquirido la capacidad de percibir moléculas que indican que están siendo atacadas por un patógeno. El primer nivel del sistema inmune depende de la presencia de receptores transmembrana denominados PRRs (Pattern-Recognition Receptors) que son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) o patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs, Microbe-Associated Molecular Patterns) los cuales tradicionalmente se denominan elicitores por ser capaces de activar los sistemas de defensa. Gran parte de los PAMPs son moléculas esenciales para el patógeno que no pueden ser suprimidas o atenuadas sin afectar el desarrollo del patógeno; ello proporcionó a las plantas una ventaja evolutiva para poder detectarlos. Entre los MAMPs se encuentran moléculas de funciones básicas de los microorganismos, tales como lipopolisacáridos, peptidoglucanos, oligómeros de quitina y glucanos que son componentes de las paredes celulares y membranas de bacterias y hongos, como así también la flagelina, componente del flagelo bacteriano (Newman et al., 2007; Schwessinger and Ronald, 2012; Spoel and Dong, 2012). Las plantas también pueden percibir señales endógenas derivadas de sí mismas, que surgen del daño causado por la infección de patógenos. Estas señales son moléculas liberadas de forma enzimática o mecánica por la propia planta cuando es atacada y son llamadas patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, Damage-Associated Molecular Patterns).

Los PAMPs y PRRs se encuentran altamente conservados entre las distintas especies vegetales (Zipfel, 2009), sin embargo, el repertorio de efectores de los patógenos es extremadamente variable (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011). Así es que cuando los PRRs reconocen alguna molécula PAMP se activa la respuesta inmune por PAMPs (PTI, *PAMP-Triggered Immunity*) que protege a las plantas del atacante. Tales respuestas incluyen, entre otras, el fortalecimiento de la pared celular, la síntesis de calosa y la acumulación de diversas moléculas con actividad antimicrobiana. Los patógenos a menudo pueden superar este primer nivel de defensa de las plantas, por

ejemplo, mediante el uso de moléculas efectoras que inactivan la inmunidad disparada por los PAMPs o por la supresión de la señalización de PTI. En la “carrera armamentística” las plantas adquirieron una segunda línea de defensa que se activa cuando las proteínas intracelulares de resistencia reconocen estos efectores específicos del atacante y a continuación, hacen que el patógeno sea no virulento lo que se conoce como inmunidad disparada por efectores (ETI, *Effector-Triggered Immunity*) (Jones and Dangl, 2006; Panstruga et al., 2009; Pieterse et al., 2012; Fu and Dong, 2013; Ballaré, 2014).

Los insectos herbívoros son detectados por las plantas al percibir los DAMPs así como otros patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMPs, *Herbivore-Associated molecular pattern*) (Keinänen et al., 2001; Howe and Jander, 2008; Bonaventure, 2012; Erb et al., 2012; Heil et al., 2012). Se han identificado múltiples HAMPs entre los que se encuentran los ácidos grasos conjugados con aminoácidos (FACs, *Fatty acid-Amino acid Conjugates*) (Alborn et al., 1997), caeliferrinas, inceptinas, oligourónidos, glucosa oxidasa, β -glucosidasa, y lipasas (Bonaventure, 2012; Erb et al., 2012). Los FACs son las señales de insectos mejor caracterizadas y están presentes en las secreciones orales de la mayoría de las larvas de lepidópteros (Yoshinaga et al., 2010). Se sintetizan a partir de ácidos grasos producidos por las plantas (tales como los ácidos linolénico y linoléico) que se conjugan con glutamina o ácido glutámico. Los FACs no son sintetizados por las plantas por lo que proporcionan una buena señal de que están siendo atacadas por un herbívoro. Los receptores de los FACs (así como los de todos los demás HAMPs) aún no han sido identificados, tampoco queda claro si estos receptores reconocen directamente los HAMPs o algunos de sus derivados metabólicos (Bonaventure, 2012). Los insectos herbívoros también pueden producir moléculas para suprimir las defensas inducidas por las plantas que presentan analogías a las activadas por efectores de microorganismos patógenos (Hogenhout and Bos, 2011; Bonaventure, 2012; Erb et al., 2012).

1-6 Resistencia sistémica adquirida e inducida

Las plantas luego de sufrir un ataque y activar sus defensas presentan mayor resistencia si sufren un nuevo ataque. Este fenómeno se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual se activa en forma local y también de manera sistémica en zonas alejadas del sitio donde se produjo el ataque, protegiendo así los tejidos sanos contra un ataque posterior. Estas respuestas generalmente de larga

duración se activan bajo un amplio rango de patógenos, tales como hongos, virus y bacterias (Durrant and Dong, 2004; Vlot et al., 2009). La respuesta SAR se produce luego de la activación de las respuestas PTI o ETI y se caracteriza por una activación coordinada y específica de los genes *PR* (*PATOGENESIS RELATED*) los cuales en su mayoría codifican para proteínas con actividad antimicrobiana (van Loon et al., 2006). La activación del SAR está asociada con un aumento de la fitohormona SA, tanto en el lugar de la infección como en toda la planta (Mishina and Zeier, 2007; Tsuda et al., 2009). Determinados microorganismos beneficiosos para las plantas como los hongos micorrícicos y las rizobacterias, entre otros, son capaces de inducir un fenotipo similar a la inmunidad sistémica llamada resistencia sistémica inducida (ISR) (van Loon et al., 1998; Pozo and Azcón-Aguilar, 2007). La respuesta ISR, al igual a la SAR, es duradera y de amplio rango pero es independiente de la vía del SA. Esta respuesta es dependiente de las vías de señalización reguladas por las fitohormonas JA y etileno (ET). La activación de la respuesta ISR por microorganismos beneficiosos no conlleva a la inducción directa de los mecanismos de defensas de la planta, lo que tendría un costo energético importante, sino que está asociada con un aumento en su capacidad para activar las defensas tras el ataque de un patógeno, fenómeno conocido como “*priming*” (Pozo et al., 2008; Van der Ent et al., 2009). La inducción de resistencia mediante *priming* tiene un costo mínimo sobre el crecimiento de la planta ya que la respuesta de defensa solo se activa en el caso del reconocimiento de un atacante.

1-7 Fitohormonas

Las fitohormonas, u hormonas vegetales, son las principales moléculas de señalización interna de las plantas; son esenciales para la integración de las diferentes señales internas y juegan un papel importante en el desarrollo, el crecimiento, las defensas y la muerte celular.

Existe abundante información acerca de cómo los sistemas de defensas están coordinados por una serie de hormonas cuya síntesis se activa en respuesta al ataque de diferentes organismos consumidores. Las principales hormonas que controlan los mecanismos de defensa son el SA, el JA y el ET (Ballaré, 2009; Pieterse et al., 2012; Ballaré, 2014).

El mecanismo de defensa específico activado dependerá del estilo de vida del patógeno atacante a combatir; en casos de biótropos las plantas activan las respuestas inducidas por SA, a la cual son altamente sensibles, mientras que si son patógenos

necrótrofos o insectos herbívoros se activan las defensas mediadas por el JA y el ET (Thomma et al., 2001; Kessler and Baldwin, 2002; Glazebrook, 2005).

1-7-1 El ácido jasmónico

El JA es una oxilipina implicada en las respuestas a señales ambientales y de desarrollo durante el ciclo de vida de las plantas. Se encuentra involucrado en numerosos procesos incluyendo el desarrollo de tricomas y de estambres, el crecimiento de la raíz, la determinación del sexo, la fertilidad, las respuestas a la radiación UV, la senescencia y la activación de respuestas de defensa (Chung et al., 2009; Fonseca et al., 2009; Pauwels and Goossens, 2011; Wager and Browse, 2012).

1-7-1-1 Biosíntesis del JA

Los jasmonatos (JAs), el JA y sus derivados son componentes lipídicos, se biosintetizan por la vía de las oxilipinas (Tretner et al., 2008; Gfeller et al., 2010). Se descubrieron en 1962 cuando se identificó al MeJA (metil-JA) como un componente principal de la esencia del jazmín (Demole et al., 1962). Tanto la vía de biosíntesis como las enzimas que intervienen en la misma se encuentran ampliamente estudiadas (Figura 1.5) (Wasternack, 2007; Schaller and Stintzi, 2009; Wasternack and Kombrink, 2009; Kombrink, 2012).

La biosíntesis del JA comienza con la liberación de ácido α -linolénico (18:3) de la membrana de los cloroplastos, que luego de ser oxidado por la enzima LOX (13-lipoxigenasa) pasa a 13(S)-HPTO [*13(S)-hidroperoxy-octadecatrienoic acid*], el cual puede ser metabolizado para formar distintas clases de oxilipinas (Feussner and Wasternack, 2002; Mosblech et al., 2009). En el paso siguiente, 13(S)-HPTO es transformado a 12-13(S)-ETO [*12-13(S)-epoxy-octadecatrienoic acid*] por la enzima AOS (*allene oxide synthase*) (Park et al., 2002; von Malek et al., 2002). Sobre este último producto actúa la enzima AOC (*allene oxide ciclase*) dando lugar a OPDA [(9S, 13S)-12-oxo-phytodienoic acid] estableciéndose de este modo la configuración estereoquímica natural del JA (Ziegler et al., 2000). El OPDA es el primer producto biológicamente activo de esta vía (Stenzel et al., 2003; Wasternack, 2007), el que posteriormente migra de los cloroplastos a los peroxisomas donde la biosíntesis continua hasta formar (+)-7-iso-JA. El JA está sujeto a diversas modificaciones enzimáticas originando de este modo numerosos metabolitos (Wasternack, 2007; Koo and Howe, 2012). Entre estos se incluye al JA conjugado con distintos aminoácidos, tales como la isoleucina. Esta conjugación forma JA-Ile que constituye la forma natural

más activa de los JAs (Fonseca et al., 2009). Además, el JA se puede conjugar con Leu, Val, Tyr, Trp y otras moléculas (Staswick and Tiryaki, 2004; Kramell et al., 2005; Staswick, 2009). El JA puede sufrir otras transformaciones como la metilación o la glucosilación dando lugar a MeJA (Gfeller et al., 2010) o JAG (Kourtchenko et al., 2007) respectivamente. La interconversión entre las distintas formas en las que se puede presentar el JA parece constituir un mecanismo de activación - desactivación y por lo tanto jugar un rol durante la regulación de esta vía (Miersch et al., 2008).

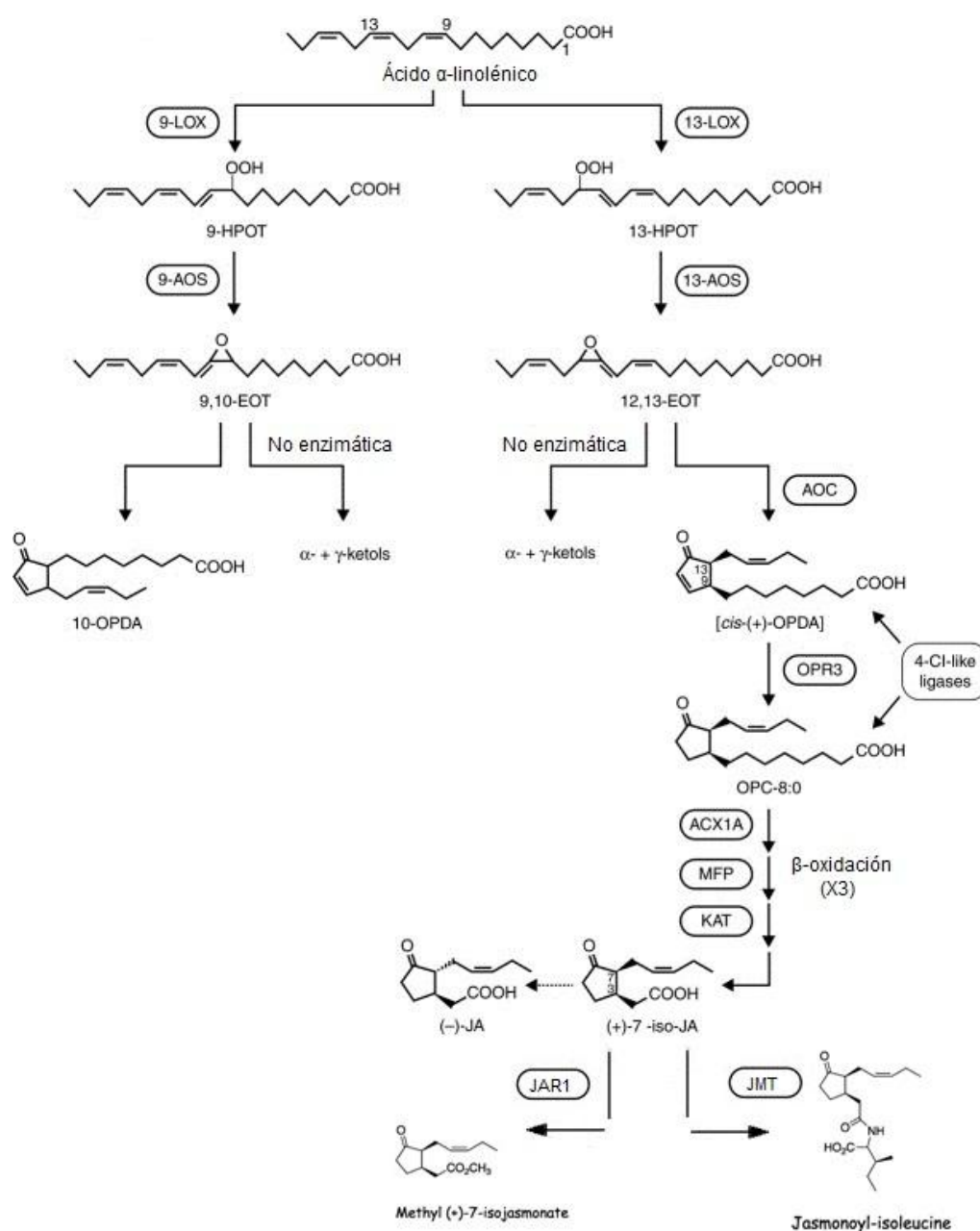


Figura 1.5: Esquema metabólico de la ruta biosintética de las oxilipinas incluyendo las ramas de la 9- y 13-lipoxigenasas (9-LOX y 13-LOX) y biosíntesis de los JAs. Modificado de (Wasternack, 2007).

1-7-1-2 Represores de la vía de los JAs

1-7-1-2-1 Las proteínas JAZ

Las proteínas de la familia JAZ (JASMONATE ZIM DOMAIN) se caracterizan por actuar como reguladores negativos, siendo represores transcripcionales, de las respuestas de la vía de los JAs. Las proteínas JAZs podrían jugar un papel principal en la atenuación de la sensibilidad a los JAs en respuesta a señales fisiológicas y ambientales. En *Arabidopsis* se conocen 12 miembros de la familia y se denominan JAZ 1-12 (Chung et al., 2009).

Las JAZs son miembros de la familia de las proteínas TIFY, llamadas así por poseer el motivo TIFY (TIF[F/Y]XG) altamente conservado, ubicado en el dominio ZIM (Vanholme et al., 2007; Chung et al., 2009). Este último no contiene el dominio *zinc finger* de tipo GATA, por lo que se las clasifica como parte del grupo II de la familia TIFY (Vanholme et al., 2007).

Esta familia de represores se caracteriza por poseer una alta variabilidad en su secuencia pero con sus tres dominios, el N-terminal (NT), el ZIM y Jas, altamente conservados (Chung and Howe, 2009; Wager and Browse, 2012) (Figura 1.6). El dominio NT es el menos caracterizado aunque se ha demostrado que es importante para las interacciones entre la proteína JAZ1 y el represor RGA (*Repressor of GAI1-3*) de la vía de las GAs, por lo que este dominio estaría involucrado en un *crosstalk* con la vía de señalización de las GAs (Kazan and Manners, 2012; Wager and Browse, 2012).

El dominio ZIM está formado por 30 aminoácidos en el centro de las proteínas JAZ que contiene el motivo TIFY (Vanholme et al., 2007). Este último es necesario y suficiente para la hetero u homodimerización (JAZ-JAZ), que puede tener lugar independientemente de la presencia de JA-Ile (Chini et al., 2009; Fonseca et al., 2009; Pauwels and Goossens, 2011). Esta dimerización puede ser importante para la localización nuclear de estos represores como cuerpos nucleares (Grunewald et al., 2009). El dominio ZIM es también responsable de la interacción con la proteína NINJA (NOVEL INTERACTOR OF JAZ, véase más abajo) (Pauwels et al., 2010).

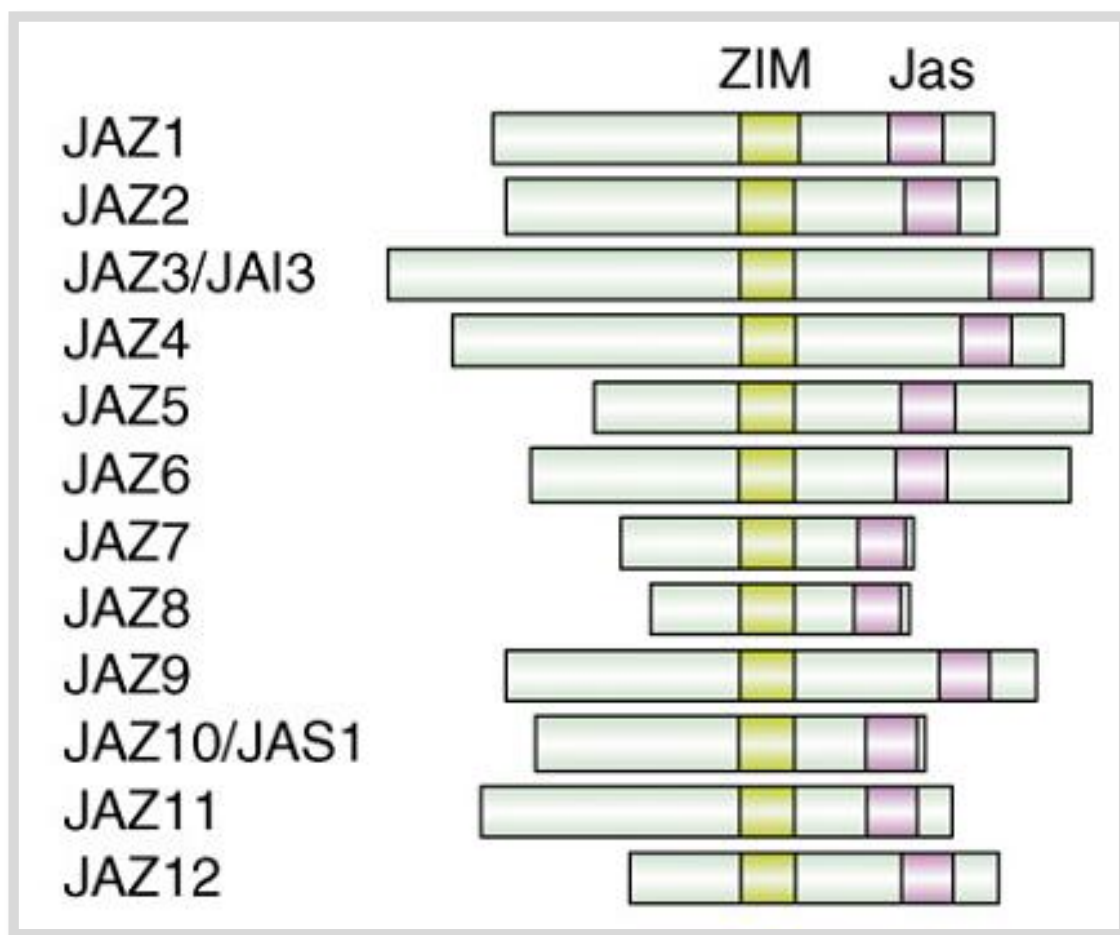


Figura 1.6: Esquema de las proteínas JAZ en *A. thaliana*. Se muestran los tamaños relativos, así como la posición de los dominios altamente conservados ZIM y Jas de las doce proteínas. Editado de Staswick (2008).

El dominio Jas se encuentra situado cerca de la región C-terminal, esta secuencia participa en la interacción proteína-proteína con distintos factores de transcripción, por ejemplo MYC2 (codificado por el gen *JIN1*; *JASMONATE INSENSITIVE 1*), y con la proteína COI1 (*CORONATINE INSENSITIVITY 1*). Posee una secuencia altamente conservada, LPIARR, la cual es necesaria y suficiente para la interacción JAZ-COI1 en presencia de JAs bioactivos (Katsir et al., 2008; Melotto et al., 2008; Chini et al., 2009; Fonseca et al., 2009; Sheard et al., 2010).

1-7-1-2-2 Co-represores reclutados por las proteínas JAZ

Aunque la evidencia genética, bioquímica y molecular ha demostrado que las proteínas JAZ son represores transcripcionales de la vía de los JAs aún sigue siendo desconocido cómo es que funciona esta represión a nivel molecular. La ausencia de un motivo de represión conocido en la mayoría de las proteínas JAZ sugiere que éstas reprimen la transcripción mediante el reclutamiento de co-represores. En tal sentido, se

ha demostrado que las proteínas JAZ reclutan miembros de la familia de co-represores Groucho (Gro)/Tup1, como TPL (TOPLESS), TPR2 (TOPLESS-RELATED 2) y TPR3 (TOPLESS-RELATED 3) (Kazan, 2006; Fernández-Calvo et al., 2011). En eucariotas, estos represores actúan a través de la formación de complejos con enzimas modificadoras de histonas, como las deacetilasas de histonas (HDAs) que generan la compactación de la cromatina impidiendo de este modo el acceso del aparato de transcripción celular con lo que se inactiva la expresión de genes presentes en estas regiones (Payankaulam et al., 2010). Estudios recientes indican las HDAs interactúan con elementos de la vía de los JAs y en mutantes de HDAs esta vía de señalización se encuentra alterada (Devoto et al., 2002; Zhou et al., 2005; Wu et al., 2008).

El mapa interactómico de *A. thaliana* sugiere un papel global para el co-represor TPL en la regulación de génica (Consortium, 2011). Por su parte el reclutamiento de TPL generado por las proteínas JAZ se logra a través de un motivo EAR (ERF-ASSOCIATED AMPHIPHILIC REPRESSION) que contiene la proteína NINJA (Figura 1.7) (Pauwels et al., 2010). El motivo EAR (LxLxLx o DLNxxP, donde x es cualquier aminoácido) es conocido por actuar en la represión génica (Kazan, 2006). Se ha encontrado que dos miembros de la familia JAZ, JAZ7 y JAZ8 no interactúan con la proteína NINJA (Pauwels et al., 2010) pero ellas contienen en su secuencia aminoacídica el motivo EAR altamente conservado (LELRL) lo que sugiere que podrían actuar de forma independiente de la proteína NINJA interactuando directamente con TPL (Pauwels and Goossens, 2011).

1-7-1-3 Percepción de los jasmonatos

Recientemente se han hecho avances significativos en el conocimiento de los mecanismos de percepción de los JAs en las células vegetales (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007; Melotto et al., 2008; Yan et al., 2009; Pauwels et al., 2010; Sheard et al., 2010). Se ha demostrado que la percepción de JA-Ile se logra mediante su interacción con un co-receptor formado por la proteína COI1, un componente F-box (Xie et al., 1998) de un complejo SCF (SKIP-CULLIN-F-box) que actúa como una E3 ubiquitín ligasa (Zheng et al., 2002) y las proteínas JAZ (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). El JA-Ile estimula la unión específica de COI1 con las proteínas JAZ lo que conduce a una ubiquitinación de las JAZs por el complejo SCF^{COI1} y su posterior degradación por el proteasoma 26S. Al degradarse las proteínas JAZ se logra activar la vía de los JAs mediante una reprogramación transcripcional de la célula (Pauwels and Goossens, 2011; Kazan and Manners, 2012; Shyu et al., 2012) (Figura

1.7). La transcripción de los genes de respuesta a los JAs, impulsada por el ataque de herbívoros, infecciones de patógenos o daño conduce a la producción de metabolitos de defensa tanto en los órganos afectados directamente como en los no afectados. Estas respuestas les proporcionan a las plantas una protección sistemática contra futuros ataques (Howe and Jander, 2008; Koo et al., 2009).

El primer factor de transcripción (FT) en identificarse en *A. thaliana* que participa en la regulación de la respuesta de los JAs fue MYC2 (Lorenzo et al., 2004). Posteriormente se descubrieron dos homólogos a los que se denominaron MYC3 y MYC4; estos también interactúan con las proteínas JAZ a través su dominio C-terminal (Fernández-Calvo et al., 2011; Pauwels and Goossens, 2011). El FT MYC2 regula la expresión génica particularmente de aquellos genes que son inducidos en respuesta a heridas o al ataque de insectos (Lorenzo et al., 2004). Éste regula de manera diferencial dos grupos de genes de respuesta a los JAs (Figura 3.1). Por un lado activa genes de respuesta a daños e insectos y, por otro, reprime genes relacionados con defensa a patógenos (Boter et al., 2004; Lorenzo et al., 2004; Dombrecht et al., 2007). Por ejemplo, regula positivamente la expresión de genes como *VSP* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN*) y *LOX* (*LIPOXYGENASE 2*) (Boter et al., 2004; Lorenzo et al., 2004) y negativamente genes como *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*), *CHIB* (*BASIC CHITINASE*) y *HEL* (*HEVEIN-LIKE PROTEIN*) (Anderson et al., 2004; Lorenzo et al., 2004).

Asimismo se ha identificado al FT ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1), que pertenece a la familia ERF/AP2 (ERF/APETALA2) e integra las señales de la vía de los JAs y del ET, modula la expresión de algunos genes regulados por el FT MYC2 aunque lo hace de manera opuesta (Berrocal-Lobo et al., 2002; Lorenzo et al., 2003; McGrath et al., 2005; Pré et al., 2008). De este modo activa la expresión de genes de la vía JA/ET relacionados con defensa frente a patógenos necrótrofos como *PDF1.2* y *CHIB* y reprime la expresión de genes relacionados con respuesta a daños y herbívoros como *VSP2* (Berrocal-Lobo et al., 2002; Lorenzo et al., 2003). Además de ERF1, otros FTs de la familia ERF/AP2, participan en esta interrelación de las vías de los JAs y del ET algunos como activadores ERF2 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2) u ORA59 (OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF-domain protein 59) y otros como represores ERF4 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 4) (McGrath et al., 2005; Pré et al., 2008; Zarei et al., 2011). Sin embargo, MYC2 reprime varios genes que son inducidos en respuesta a patógenos por la acción del FT ERF1 (Browse, 2009).

Entre los genes de defensa marcadores más utilizados de la respuesta a los JAs y al ET se encuentra *PDF1.2*, el cual codifica para una proteína con actividad antimicrobiana (Penninckx et al., 1998). Los JAs también activan la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios empleados tanto en la aclimatación como en la defensa (van der Fits and Memelink, 2000; Keinänen et al., 2001; Goossens et al., 2003). Los compuestos fenólicos pertenecen a una familia muy amplia de metabolitos secundarios de plantas cuya síntesis y liberación se produce frente a daños, infecciones, ataque de patógenos y/o herbivoría. Debido al rol que poseen como componentes de defensa se utilizan los niveles de los compuestos fenólicos solubles totales y antocianas como marcadores de la vía de los JAs.

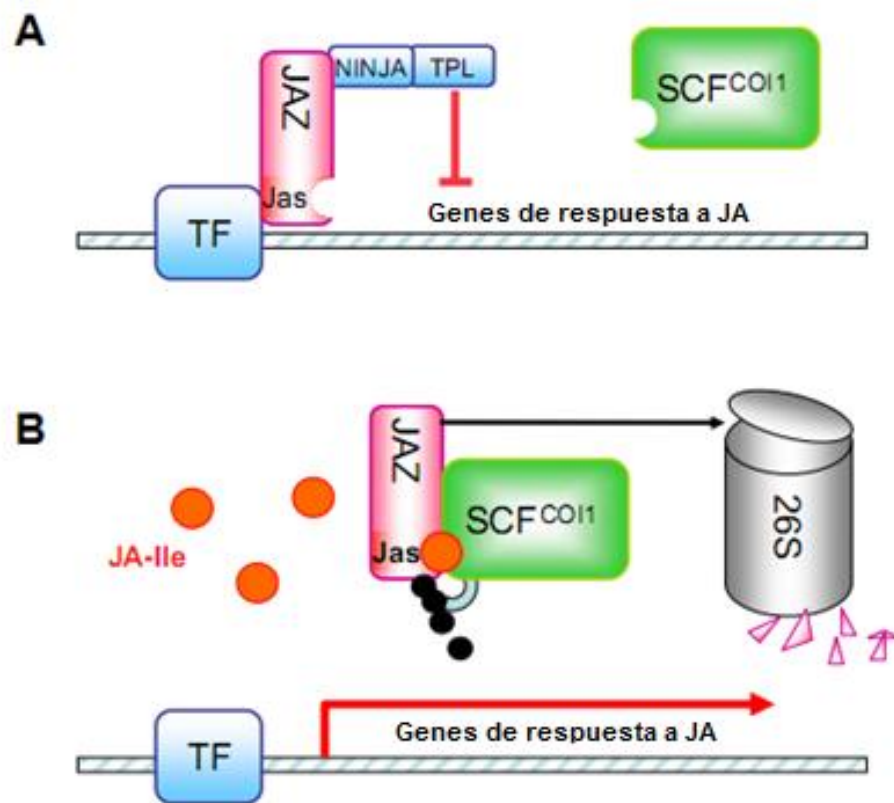


Figura 1.7: Modelo actual de percepción de JA y activación de genes de respuesta. Activación de la vía de JA en respuesta a la degradación de proteínas represoras JAZ **A)** en ausencia de JA bioactivos, los genes de respuesta a JA están reprimidos debido a la interacción de los factores de transcripción (TF) con proteínas represoras JAZ, las que controlan la expresión de genes a través de su interacción con el adaptador NINJA y las proteínas co-represoras TPL (Pauwels et al., 2010), y presumiblemente a través de otros mecanismos de represión (Howe, 2010) **B)** En presencia de JA bioactivos (que se producen en respuesta al ataque de herbívoros, círculos naranjas) las proteínas JAZ interactúan vía su dominio Jas con la ubiquitin-ligasa SCF^{COI1}, lo que las marca para degradación en el proteasoma 26S, y des-reprime así la transcripción de los genes de respuesta. Editado de Ballaré (2011).

1-7-2 El Acido Salicílico

La hormona vegetal SA juega un papel fundamental en la señalización de respuestas de resistencia contra enfermedades (Vlot et al., 2009; Fu and Dong, 2013). Constituye un compuesto fenólico que puede ser sintetizado a partir del metabolito primario corismato a través de dos vías enzimáticas distintas, una que involucra a PAL (FENILALANINA AMONIO LIASA) y la otra a ICS/SID2 (ISOCORISMATO SINTASA) (Garcion and Métraux, 2006). La biosíntesis es activada durante la PTI y ETI a partir del reconocimiento de PAMPs o efectores provenientes de patógenos (Mishina and Zeier, 2007). Posteriormente, las proteínas EDS1 (lipase-like ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1) y PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4) actúan en el inicio de la biosíntesis de SA durante el PTI.

La señalización río abajo (*downstream*) del SA es controlada en gran medida por la proteína reguladora NPR1 (NONEXPRESSOR DE PR GENES1), que al ser activada por el SA actúa como un co-activador transcripcional de un gran conjunto de genes relacionados con la defensa (Dong, 2004; Moore et al., 2011). Los genes *PR* (*PATHOGENESIS-RELATED*) son un grupo diverso. Algunos *PR* codifican para proteínas con actividad antimicrobiana (van Loon et al., 2006) cuyo miembro mejor caracterizado es *PR-I*, utilizado a menudo como gen marcador de la respuesta al SA. Además, existen muchos factores de transcripción WRKY capaces de activar o reprimir las respuestas del SA por lo que son importantes tanto para la resistencia como para el control de la retro-alimentación de esta vía de señalización (Wang et al., 2006; Rushton et al., 2010).

En células no inducidas, la gran mayoría de las moléculas de NPR1 se encuentran en el citoplasma formando oligómeros, unidas a través de enlaces intermoleculares disulfuro (Tada et al., 2008). Constitutivamente una cantidad relativamente pequeña de monómeros de NPR1 se transloca al núcleo pero es degradada vía proteosoma y esto evita la activación prematura de los genes diana de NPR1 (Spoel et al., 2009). La inducción de la vía del SA conduce a cambios en el estado redox de la célula que generan la monomerización de NPR1 (Tada et al., 2008), produciendo grandes cantidades de monómero NPR1 que son translocadas al núcleo (Cheng et al., 2009; Monaghan J et al., 2010). En el núcleo, los monómeros NPR1 interactúan con los miembros de la familia de factores transcripcionales TGA subclase *basic leucine zipper* (bZIP) que se unen y activan a los promotores de los genes regulados por el SA, tales como la *PR-I*, (Després et al., 2000; Fan and Dong, 2002). Durante este proceso NPR1

se fosforila y posteriormente es ubiquitinada para luego ser degradada vía proteosoma. Cabe resaltar que la translocación de NPR1 constituye un paso regulatorio importante en esta vía de señalización.

Existen varios reguladores negativos que mantienen controlada la vía del SA y los genes regulados por *PR1*, tales como las proteínas NIMIN1 (NIM1-INTERACTING1), NIMIN2, NIMIN3 y la proteína SNI1 (SUPPRESSOR OF NPR1 INDUCIBLE1) que interactúan con NPR1 (Li et al., 1999; Weigel et al., 2005; Pape et al., 2010), posiblemente evitando una activación innecesaria. Las NIMINs inhiben la actividad de los promotores de genes de defensa capturando a los factores de transcripción TGA (Weigel et al., 2005), mientras que SNI1 ejerce su efecto negativo a través de la asociación con promotores de genes de defensa posiblemente mediante interacciones con proteínas de unión al ADN aún desconocidas (Song et al., 2011). Posteriormente a la activación de la vía de señalización del SA, SNI1 se elimina del promotor y así se regula positivamente la expresión génica de la respuesta inmune de la planta.

Una vez que la vía del SA se activa en el sitio de infección una respuesta similar es disparada en partes distales de la planta protegiendo los tejidos sanos contra una posible invasión posterior de patógenos. Y, además, cuando es activada se produce una represión de la vía de los JAs mediante un *crosstalk* hormonal. Ambas vías de señalización tiene un efecto antagónico sobre la otra (Kunkel and Brooks, 2002; Bostock, 2005; Brooks et al., 2005; Uppalapati et al., 2007; Pieterse et al., 2009; Thaler et al., 2012).

1-7-3 El etileno

El ET es una hormona vegetal gaseosa que participa en la germinación de semillas, desarrollo de pelos radiculares, senescencia de la flor, abscisión y maduración del fruto y en las defensas. Se produce por el metabolismo de la metionina a S-adenosil-metionina (S-AdoMet), donde casi el 80% de la metionina celular se convierte en S-AdoMet (Demianski et al., 2012). La S-AdoMet es pasada a 1-aminociclopropano-1-acido carboxílico (ACC), que luego es oxidado para formar el ET (Wang et al., 2002; Zhu et al., 2011; Shan et al., 2012).

Se conocen cinco receptores del ET en *Arabidopsis*: ETR1 (ETHYLENE RESPONSE 1), ETR2 (ETHYLENE RESPONSE 2), ERS1 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1), ERS2 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2) y EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4) (Wang et al., 2002). Estos receptores regulan negativamente la vía de

señalización del ET mediante una interacción con la proteína CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1). Esta proteína reprime a EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2), un regulador positivo esencial de las respuestas río abajo del ET, que conduce a la inactivación de los factores de transcripción EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3) y EIL1 (EIN3-LIKE PROTEIN 1) (Wang et al., 2002; Shan et al., 2012). En presencia de ET la proteína CTR1 es degradada, y por lo tanto, EIN2 es desreprimido (Qiao et al., 2009). EIN2 regula una cascada transcripcional activada por EIN3 y EIL1, lo que resulta en la activación de los FTs ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1) y EBF1-4 (ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTORS 1-4) generando un aumento en la expresión de los genes de respuesta de ET (Wang et al., 2002; Qiao et al., 2009; Zhu et al., 2011; Shan et al., 2012).

1-7-4 Las giberelinas

Las GAs son fitohormonas formadas por diterpenoides tetracíclicos que desempeñan un rol fundamental en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de las plantas. Actúan en varios procesos de su ciclo, tales como: la germinación, el crecimiento vegetativo y la floración (Yamaguchi, 2006) mediante la regulación de la transcripción génica (Ogawa et al., 2003; Cao et al., 2006; Zentella et al., 2007; Hou et al., 2008). Son sintetizadas por la vía de los terpenoides en los plástidos y luego modificadas en los retículos endoplasmáticos y en el citosol hasta que se convierten en la forma biológicamente activa (Hedden and Phillips, 2000; Olszewski et al., 2002).

Las proteínas DELLA son moléculas claves en la represión de las respuestas de crecimiento inducidas por las GAs. Pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales putativos GRAS que se encuentran altamente conservados en *Arabidopsis* y en otras especies (Pysh et al., 1999; Ikeda et al., 2001; Chandler et al., 2002; Bolle, 2004). Las GAs interaccionan con su receptor específico denominado GID1 (GIBERELINA INSENSITIVE DWARF1) y esto permite que las proteínas DELLA se unan formando un complejo proteico, en el cual estas últimas son ubiquitinadas para luego ser degradadas vía proteasoma (Dill et al., 2001; Griffiths et al., 2006; Murase K et al., 2008; Shimada A et al., 2008). Luego de ser degradadas se activa el crecimiento y desarrollo de las plantas, en respuesta a las GAs.

En *Arabidopsis* se han identificado cinco proteínas DELLA: GAI1 (*GA insensitive 1*), RGA, RGL1 (*RGA-like 1*), RGL2 (*RGA-like 2*) y RGL3 (*RGA-like3*). Estas proteínas

desempeñan papeles superpuestos y separados en la regulación del crecimiento y las respuestas mediadas por las GAs a cambios ambientales (Dill and Sun, 2001; Lee et al., 2002; Wen and Chang, 2002; Fu and Harberd, 2003; Cheng et al., 2004; Yu et al., 2004; Wild et al., 2012). Las proteínas GAI y RGA son reguladores negativos de las respuestas de GA en el control de la elongación del tallo, el tiempo a floración y el crecimiento de la raíz (Dill and Sun, 2001; Fu and Harberd, 2003). Las proteínas RGL2 son importantes en la represión de la germinación de las semillas (Lee et al., 2002). Las proteínas RGA y RGL2 desempeñan papeles dominantes en la supresión del desarrollo normal de los órganos florales (Cheng et al., 2004; Yu et al., 2004; Hou et al., 2008) y las RGL3 regulan positivamente la resistencia mediada por los JAs (Wild et al., 2012).

Las proteínas DELLA interactúan específicamente con otras proteínas inhibiendo la expresión de genes de la vía de señalización de las GAs en varios procesos de desarrollo. Por ejemplo, las DELLA interactúan con los factores de transcripción PIF3 y PIF4 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3 Y 4) impidiendo que se unan a los promotores de los genes que estos controlan (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Sin embargo, estudios recientes han revelado que muchos genes actúan río abajo de las proteínas DELLA en la vía de señalización GA, pero hasta el momento se tiene poca información de cómo son regulados. Las proteínas DELLA no poseen un dominio de unión al ADN por lo que se requiere mayor información de su interacción con distintos factores de transcripción para comprender la función represora de las DELLA en la señalización por GA durante la regulación diversos procesos de desarrollo (Hou et al., 2013).

Recientemente se ha determinado que las proteínas DELLA participan en las respuestas de defensa a estrés bióticos mediante una regulación positiva de la vía de señalización de los JAs, la cual ocurre a través de una interacción con elementos esta vía (Yang et al., 1996; Hou et al., 2008; Navarro et al., 2008; Cheng et al., 2009; Wild et al., 2012).

1-8 El dilema de las plantas

La competencia y la necesidad de defender los tejidos frente al ataque de herbívoros y patógenos son fuerzas selectivas importantes en la evolución de las plantas terrestres. Las plantas pueden ajustar la inversión de energía destinada a defensas en función del riesgo de competencia por la luz con sus vecinas. Las evidencias

fisiológicas y genéticas indican que la expresión del SAS está correlacionada con una reducción de la expresión de genes marcadores de defensa y con un incremento en la vulnerabilidad a insectos herbívoros y patógenos necrótrofos (McGuire and Agrawal, 2005; Izaguirre et al., 2006; Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012). Este compromiso de asignación de recursos es a menudo conocido como el "dilema de las plantas" (Herms and Mattson, 1992; Cipollini, 2004; Ballaré, 2009). Así las plantas deben crecer lo suficientemente rápido como para ser competitivas con sus vecinos y, al mismo tiempo, asignar recursos a la defensa para poder sobrevivir en ambientes donde existen organismos consumidores.

La regulación negativa de las defensas de las plantas que se encuentran en competencia lumínica con sus vecinas o bajo un riesgo inminente de competencia se correlaciona con una disminución en la sensibilidad de los tejidos a los JAs (Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012; de Wit et al., 2013; Leone et al., 2014). Se proponen múltiples hormonas que podrían mediar la regulación de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL (Figura 1.8). Entre ellas podemos mencionar las GA, citoquininas, auxinas, ET, brasinosteroides y el SA. Así como las proteínas JAZ, las cuales se han reportado que en condiciones de bajas relaciones R:RL se producen cambios en los niveles de expresión (Moreno et al., 2009) y en la estabilidad de algunas de ellas (Leone et al., 2014).

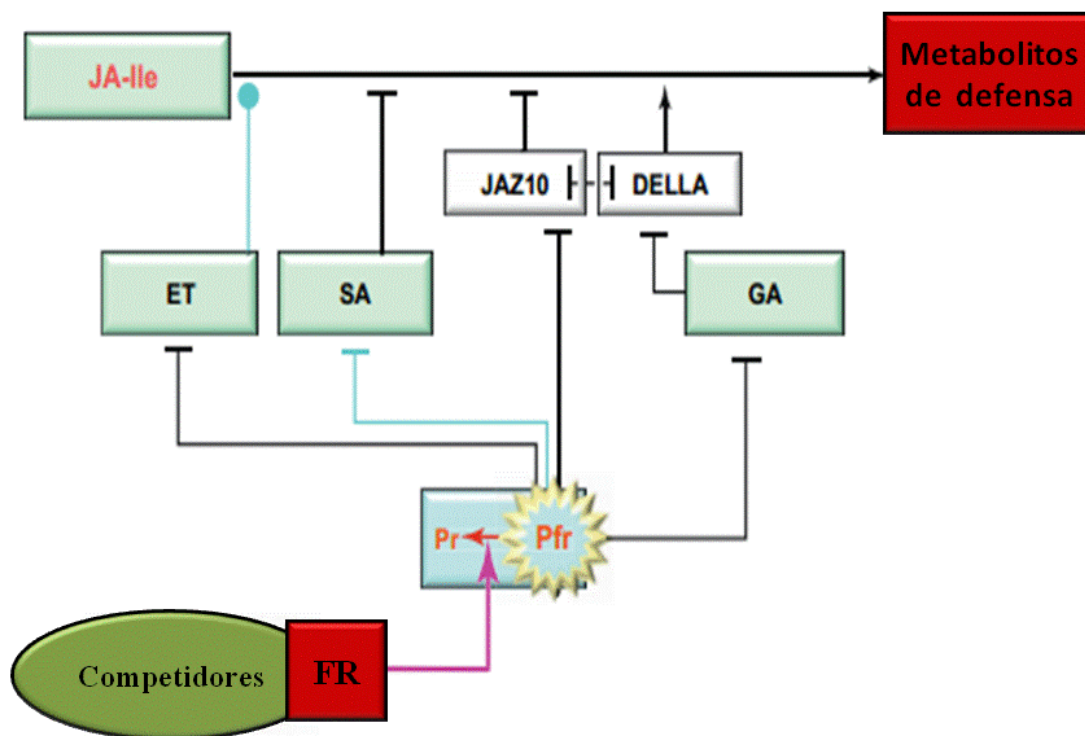


Figura 1.8: Esquema conceptual de las conexiones potenciales entre el phyB y la señalización de los JAs en la modulación de defensas en respuesta a la proximidad de plantas vecinas. El RL reflejado por plantas vecinas (FR) promueve el pasaje de la forma activa de phyB (Pfr) a la forma inactiva (Pr). Una caída en el nivel de Pfr lleva a un aumento en los niveles de expresión de ciertos genes JAZ en tejidos expuestos a RL, lo que podría deprimir las respuestas a los JAs en condiciones de competencia con plantas vecinas. La inactivación de phyB también produce aumentos en los niveles de una serie de hormonas promotoras del crecimiento, incluyendo GA y ET. Se ha demostrado que las GAs son antagonistas de las respuestas de los JAs. Las GAs actúan promoviendo la degradación de DELLA, que según evidencia reciente es capaz de interactuar directamente con proteínas JAZ, inhibiendo su acción represora sobre la vía de los JAs. El ET tiene efectos diversos sobre las respuestas a los JAs, aunque en Arabidopsis es frecuentemente un regulador positivo. El ácido salicílico (SA) es el antagonista más estudiado de las respuestas a los JAs, y en algunos sistemas los niveles de SA pueden aumentar en respuesta a la inactivación de phyB. Las flechas indican promoción/activación; los conectores truncados indican represión o interacción negativa; los conectores con terminación circular indican efectos que dependen del sistema de estudio. Las líneas negras representan interacciones documentadas en Arabidopsis; las líneas celestes denotan interacciones documentadas en otras especies. ET, etileno; FR, rojo lejano; GA, giberelina; JA-Ile, jasmonyl-isoleucina; SA, ácido salicílico. Editado de Ballaré, 2011.

1-9 OBJETIVOS e HIPÓTESIS de TRABAJO

En la presente tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias se propone como **objetivo general avanzar en el entendimiento de los mecanismos que median los efectos de cambios en el ambiente lumínico asociados a la competencia sobre la vía de señalización de los JAs**. La misma se centra en la región del R y RL del espectro solar debido a la importancia que reviste como señal de competencia durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, tanto en canopeos naturales como de cultivos.

El modelo de trabajo utilizado en esta tesis se basa en la idea general que el efecto de la proximidad de plantas vecinas reduciendo la expresión del sistemas de defensa, está mediado principalmente por una regulación negativa de la vía de los JAs en los tejidos (Moreno et al., 2009). Este modelo contiene una serie de **hipótesis específicas** acerca del mecanismo subyacente. A continuación se mencionan las hipótesis planteadas en esta tesis doctoral:

- **H1:** la de-sensibilización de los tejidos a los JAs involucra la activación de elementos de la vía del SA (antagónica del JA). Se espera que en mutantes deficientes en la producción de SA (*sid2-1*) como en mutantes de proteínas claves inducidas por el SA (*npr1*), la respuesta de los JAs no se encuentre disminuida en plantas expuestas a RL (Capítulo 3).
- **H2:** la de-sensibilización de los tejidos a los JAs está mediada por un aumento en la expresión y/o estabilidad de los reguladores negativos de la respuesta a los JAs. Represores de la familia de las proteínas JAZ se encuentran aumentados en plantas tratadas con RL, entre ellos JAZ10. Se estudiará con mayor detalle la regulación lumínica de JAZ10 y sus variantes de “*splicing*” (Capítulo 3).
- **H3:** la de-sensibilización de los tejidos a los JAs involucra la acción de proteínas DELLA, que son inhibidoras de elementos tempranos de la señalización del fitocromo (PIF). Se espera que los genotipos que presenten proteínas DELLA estables (mutantes *gai-1*) conserven su respuesta a los JAs aún en presencia de RL, mientras que los genotipos mutantes con DELLA no funcionales (cuádruples y quíntuples mutantes) presenten fenotipos de susceptibilidad constitutiva (Capítulo 4).

- **H4:** la de-sensibilización de los tejidos frente a los JAs está mediada por cambios en la estructura de la cromatina. Modificaciones post-traduccionales de las histonas, incluyendo la acetilación, juegan un papel clave en la actividad génica. En mutantes en los que la HDA6 no es funcional (por ej. *axe1-5* o *axe1-4*), o plantas a las que se les aplique trichostatin A (TSA, inhibidor de las HDAs) se espera que conserven su respuesta a los JAs en presencia RL (Capítulo 5).

De las hipótesis expuestas se desprenden los siguientes **objetivos específicos:**

- Evaluar los mecanismos fisiológicos activados por el RL implicados en la de-sensibilización de los tejidos frente a los JAs.
- Determinar si elementos de la vía del SA actúan en la de-sensibilización de los tejidos a los JAs frente a bajas relaciones R:RL.
- Determinar si las variantes de *splicing* de JAZ10, con distinta sensibilidad al JA, juegan un papel en la de-sensibilización de los tejidos a los JAs producida por bajas relaciones R:RL.
- Determinar si las proteínas DELLA participan en la de-sensibilización de los tejidos a los JAs frente a bajas relaciones R:RL.
- Determinar el rol de la hipo-acetilación de histonas en la de-sensibilización de los tejidos a los JAs causada por bajas relaciones R:RL.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos

2-1 MATERIALES

2-1-1 Líneas utilizadas

En esta tesis se utilizaron plantas de *A. thaliana* de los ecotipos salvajes Columbia (Col-0) y Landsberg erecta (Ler-0) obtenidas del *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, www.arabidopsis.org). Además se utilizaron ecotipos mutantes y transgénicos obtenidos del ABRC y donados por distintos laboratorios de investigación (Cuadro 2.1).

2-1-2 Germinación de semillas de *A. thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* utilizadas fueron esterilizadas durante 3-5 h con cloro gaseoso antes de ser sometidas al protocolo de germinación. Estas semillas se emplearon tanto para experimentos *in vitro* como en macetas. Para el cultivo *in vitro* se empleó medio Murashige Skoog (MS) al 0,5% suplementado con 1,5 % de sacarosa y 0,7% de agar. El intercambio gaseoso se aseguró mediante filtros en la tapa del frasco (Figura 2.1). Una vez sembradas, las semillas se incubaron en oscuridad a 4°C durante 48-72 h, luego se les dio un pulso de luz roja durante 1 h para inducir y sincronizar la germinación, finalmente fueron transferidas a una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 8 h de luz blanca. La temperatura se mantuvo entre 20 y 25°C.

Para los experimentos en macetas, las semillas se sembraron en placas de *Petri* en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa 1% y agar 0.8% y se incubaron en oscuridad a 4°C durante 48-72 h, luego fueron tratadas con un pulso de luz roja durante 1 h. Las plántulas de 7 días post-germinación se trasplantaron a macetas que contenían una mezcla 1:1:1 de perlita: vermiculita: turba y fueron regadas periódicamente con una solución de Hakaphos Rojo (18-18-18, Compo).

2-1-3 Cepa de *B. cinerea*

Los cultivos del hongo necrótrofo *B. cinerea* cepa B05.10 (Quidde et al., 1999) se mantuvieron en placas de agar papa glucosado (1,5% m/v agar, 2% m/m de extracto de papa liofilizado, 2% m/m glucosa) en una cámara de cultivo a 25-30°C.

Genotipo	Fondo (background)	Descripción
Col-0	Col-0	Salvaje
Ler-0	Ler-0	Salvaje
<i>npr1</i>	Col-0	Mutante de la proteína NPR1
<i>sid2.1</i>	Col-0	Mutante de la proteína SID2.1
<i>phyB9</i>	Col-0	Mutante del PHYB
35S::ERF1/ <i>coil-1</i>	Col-0	Sobreexpresante del FT ERF1 Mutante de la proteína COI1
35S::ERF1/COI1-1	Col-0	Sobreexpresante del FT ERF1
<i>jaz10.1</i>	Col-0	Mutante de la proteína JAZ10
<i>jaz10/PJAZ10::JAZ10.1</i>	Col-0	Mutante de la proteína JAZ10 Suplementada con JAZ10.1
<i>jaz10/PJAZ10::JAZ10.3</i>	Col-0	Mutante de la proteína JAZ10 Suplementada con JAZ10.3
<i>jaz10/PJAZ10::JAZ10.4</i>	Col-0	Mutante de la proteína JAZ10 Suplementada con JAZ10.4
<i>4xdella</i>	Ler-0	Mutante de la proteínas GAI1 , RGA, RGL1 y RGL2
<i>5xdella</i>	Ler-0	Mutante de las proteínas GAI1 , RGA, RGL1, RGL2 y RGL3
<i>gai1</i>	Ler-0	Mutante de la proteína gai1 (ganancia de función)
<i>axe1.4</i>	Col-0	Mutante de la proteína HDA6
<i>axe1.5</i>	Col-0	Mutante de la proteína HDA6

Cuadro 2.1: Listado de líneas de *A. thaliana* utilizadas. Se puede apreciar el nombre del genotipo, el fondo utilizado para generarla, así como la mutación o transgénesis que poseen las mismas.

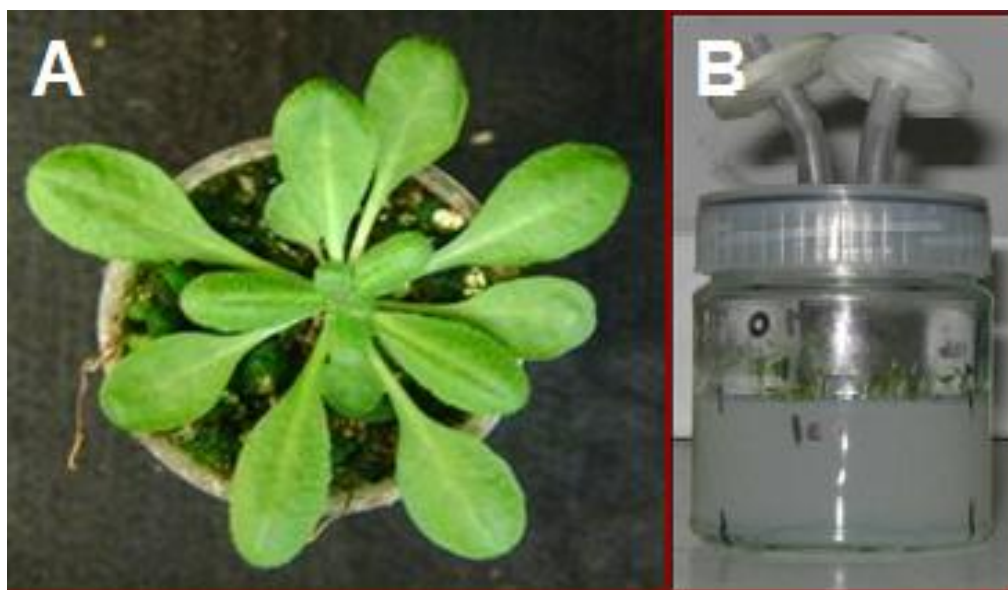


Figura 2.1: Fotos de plantas utilizadas. En **A** se puede observar una planta cultivada en maceta y en **B** plantas cultivadas *in-vitro*.

2-2 MÉTODOS

2-2-1 Simulación de presencia de plantas vecinas: tratamiento con RL

Las plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas en cámara de cultivo bajo luz blanca de tubos fluorescentes, recibiendo un PAR de entre 110 y 125 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, hasta la tercer o cuarta semana de vida. Para la aplicación del tratamiento lumínico con RL las plantas fueron alineadas frente a un banco de lámparas incandescentes cubierto con una combinación de tres filtros de acrílico azul (Paolini 2031, Acrílicos Ambin, Buenos Aires, Argentina, 2,4 mm de espesor) y un filtro rojo (Paolini 2053, Acrílicos Ambin, Buenos Aires, Argentina, 2,4 mm de espesor) (Figura 2.2). Para las plantas control se emplearon filtros opacos (tratamiento Ambiente). Entre las lámparas y los filtros se colocaron recipientes de vidrio con circulación de agua para absorber el calor generado por las lámparas. En los distintos experimentos mostrados en esta tesis, no se registraron diferencias en la temperatura del aire asociadas a los tratamientos lumínicos.

Los niveles de relación R:RL se midieron con un radiómetro Skye SKR100/SKR110 (Skye Instruments, Ltd., UK). Los valores de relación R:RL fueron cercanos a 0,5. La eficiencia de los tratamientos lumínicos se estimó midiendo el ángulo de inserción foliar respecto del suelo. Esta caída en la relación R:RL simuló el efecto de la proximidad de plantas vecinas de un canopeo de índice de área foliar de 0,5, donde el

sombreado mutuo es despreciable (Izaguirre et al., 2006; Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012).

Las plantas comenzaron a irradiarse entre uno y cuatro días antes de los tratamientos de herbivoría (real o simulada) o de los desafíos con patógenos.



Figura 2.2: Esquema del protocolo utilizado para la simulación de plantas vecinas, aplicando RL en forma lateral.

2-2-2 Tratamiento de herbivoría simulada con la aplicación de MeJA exógeno

La inducción química de las respuestas controladas por el JA se realizó rociando las plantas de *A. thaliana* de tres semanas de edad cultivadas en sustrato. Se empleó una solución acuosa de 0, 100, 200 o 450 μM MeJA (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wi, USA). Para facilitar la disolución del MeJA las soluciones fueron preparadas con etanol en una concentración de 4 ‰ en agua *MilliQ*. Las plantas control se rociaron con una solución acuosa de etanol absoluto 4‰. En los experimentos realizados *in vitro* se adicionó 1 mL de una solución 100 μM de MeJA esterilizado por filtración (preparado de igual manera que para los experimentos de plantas en sustrato) a los frascos que contenían plantas de 10 días de germinadas, mientras que a los controles se les agregó 1 ml de agua estéril. Luego, a diferentes tiempos post-inducción, las plántulas fueron cosechadas e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido para la realización de posteriores estudios de expresión génica (Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012).

2-2-3 Tratamiento con inhibidores de deacetilasas de histonas, Trichostatin A (TSA)

Estos ensayos se realizaron *in vitro*, no se pudieron realizar en plantas adultas debido a los costos del inhibidor. En estos experimentos se utilizaron plantas de *A. thaliana* variedad Col-0 de 10 días post-germinación cultivadas en frascos de vidrio con medio de cultivo. En estos ensayos las plantas se dividieron en 8 grupos, 4 fueron para control y 4 para tratamiento con TSA. De cada uno de los cuatro grupos se tomaron dos frascos que fueron expuestos a bajas relaciones R:RL en la última hora de luz del día 9 post-germinación y los otros dos frascos permanecieron en condiciones normales de luz. Luego, en el día 10 pasada la primera hora de luz a uno de los dos frascos de cada tratamiento se le agregó una solución 100 μ M de MeJA y al otro agua como control. A las 4 h del agregado de MeJA las plantas se cosecharon y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente fueron utilizadas para análisis de expresión génica.

Se trataron con una solución 5 μ M de TSA (InvivoGen). Se adicionó en forma líquida 1 mL del inhibidor esterilizado por filtración por frasco. Antes de la aplicación el inhibidor fue disuelto en DMSO (1 mg/ mL) según las instrucciones del fabricante. En los frascos control se adicionó 1 mL de agua estéril conteniendo la misma proporción de DMSO que en los tratados con TSA.

2-2-4 Bioensayos con *B. cinerea*

Previo al bioensayo se seleccionaron placas donde se observaban fructificaciones de conidios. Las esporas se colectaron por lavado con agua destilada y raspado de las placas con una varilla de vidrio, se filtraron y resuspendieron en una solución de sacarosa 100 mM/KH₂PO₄ 70 mM para inducir la germinación (Elad, 1991). El recuento de esporas se realizó en cámara de *Neubauer* bajo microscopio óptico y la concentración de esporas se ajustó a un valor aproximado de 5×10^5 esporas/mL.

Para la realización de los bioensayos, se utilizaron plantas cultivadas en sustrato de cuatro a cinco semanas de edad. Las plantas se colocaron en cámaras húmedas de poliéster transparente (Figura 2.3) para facilitar la infección. Se inocularon 4 hojas jóvenes de cada roseta en la superficie adaxial con 5 μ L de la suspensión de esporas.

Las hojas inoculadas fueron cosechadas a las 48-72 h después de la inoculación, y fotografiadas. Los análisis se realizaron de dos maneras, por un lado se clasificaron las lesiones según una escala cuantitativa, en tipo I, lesión no visible; tipo II, lesión no expandida; tipo III, lesión expandida menor al 30% de la hoja; tipo IV, lesión expandida

de más del 30% de la hoja, con síntomas de clorosis y hoja colapsada (Pré et al., 2008) (Figura 2.4) y por otro lado se cuantificaron las áreas de las lesiones producidas por el hongo por análisis de imágenes usando el programa Photoshop CS5 (Adobe Systems) (Cerrudo et al., 2012).

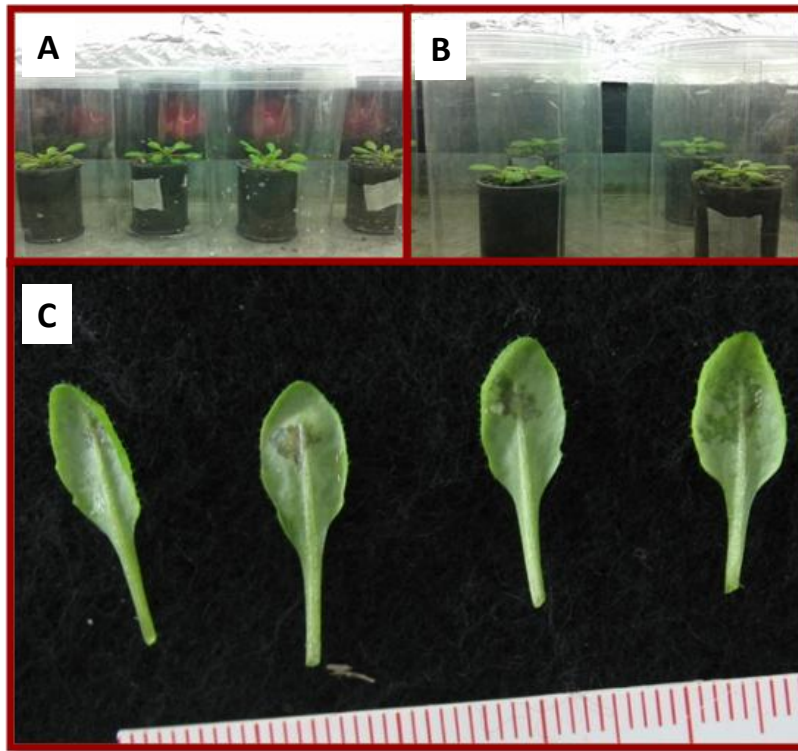


Figura 2.3: Fotografías de bioensayo con *B. cinerea*. En **A** y **B** se pueden observar las cámaras de poliéster transparente y los tratamientos de RL y control, respectivamente **C**) Daños producidos luego de 72 h de infección.

2-2-5 Medición de expresión de genes vinculados a la defensa

La expresión de los reguladores de las vías de señalización hormonales, como así también de marcadores específicos de respuesta a los JAs y de las restantes hormonas se cuantificaron mediante la técnica de PCR en tiempo real (Moreno et al., 2009; Demkura et al., 2010; Cerrudo et al., 2012).



Figura 2.4: Clasificación de las lesiones de *B. cinerea* según la severidad del daño: I, sin síntomas visibles; II, lesión no expandida; III, lesión expandida, menor al 30% de la hoja y IV, lesión expandida, mayor al 30% de la hoja, clorosis u hojas colapsadas.

2-2-6 Detección y medición de metabolitos secundarios (fenólicos solubles y antocianinas)

Para la determinación de compuestos fenólicos totales y antocianinas, se cosecharon los peciolo de las seis hojas más jóvenes de cada roseta, luego de 48-72 h de aplicado el tratamiento de herbivoría simulada (MeJA), y se colocaron en 1,5 mL de una solución de metanol-HCl (99:1 v/v). Los extractos fueron incubados por 48 hs a -20°C (Mazza et al., 2000).

Luego se tomaron 0,7 mL del metanol-HCl que contenía los peciolo y se les agregó 0,8 mL de cloroformo y 0,5 mL de agua, se centrifugaron durante 5 min. a 10.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo *ependorf*, de esta manera se eliminaron las clorofilas. Posteriormente, los fenólicos totales y antocianinas fueron cuantificados de forma relativa por espectrofotometría (UV-1700 series; Shimadzu) en base a la absorbancia de los extractos a 305 y 320 nm (fenólicos) y a 530 nm (antocianinas) (Rabino and Mancinelli, 1986; Demkura et al., 2010; Cerrudo et al., 2012; Leone et al., 2014).

2-2-7 Extracción de ARN

Las extracciones de ARN se realizaron como se detalla a continuación:

Se pulverizaron 100 mg de tejido en mortero con nitrógeno líquido y se transfirieron a tubos *ependorff* con 1 mL de Grinding buffer (0,18 M Tris; 4,5 mM

EDTA; 1 % SDS; 0,09 M LiCl; pH 8,2) y 0,34 mL de fenol : cloroformo 5:1 pH 4,7 (MP Biomedicals, Inc). Durante todo el protocolo se mantuvieron las muestras en hielo. Las muestras se homogenizaron por inversión y se centrifugaron a 11.000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante (0,8 mL) se transfirió a un nuevo tubo *ependorf* y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. para permitir la disociación completa de los complejos nucleoprotéicos. Luego se agregaron 0,7 mL de cloroformo y a continuación se agitaron los tubos a mano por inversión durante 15 seg. y se incubaron a temperatura ambiente durante 2-3 min. y se centrifugaron a 11.000 rpm a 4°C durante 15 min. La fase acuosa (superior) se transfirió a un nuevo tubo *ependorf* y se agregaron 0,25 mL de isopropanol frío más 0,25 mL de una solución de citrato de sodio 0,8 M, NaCl 1,2 M. Esta mezcla se incubó a -20°C durante 1 h y después se precipitó por centrifugación a 11.000 rpm a 4°C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 0,5 mL de etanol 70% preparado con H₂O *MilliQ* y se centrifugó a 9000 rpm a 4°C durante 15 min. El precipitado se secó en estufa a 37°C por 10 minutos. Luego se resuspendió en 20-50 µl con H₂O *MilliQ*.

El ARN se guardó a -70°C hasta el momento de ser utilizado.

2-2-8 Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron como se detalla a continuación:

Se pulverizaron 100 mg de tejido en mortero con nitrógeno líquido y se transfirieron a tubos *ependorff* con 300 µL de buffer CTAB (3% Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1,4 M NaCl, 0,2% β-Mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH= 8). Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min y posteriormente se agregaron 300 µL de cloroformo, se mezclaron las fases y se volvieron a centrifugar a 13000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo *ependorf* y se agregaron 250 µL de isopropanol (igual vol. aprox.) y se lo incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Luego se centrifugaron los tubos durante 5 min. y se eliminó el sobrenadante. Por último se lavó el precipitado dos veces con etanol 70% y se secó en estufa a 37°C durante 10 min. y se resuspendió en 30 µL de agua *MilliQ*.

El ADN se guardó a -20°C hasta el momento de ser utilizado.

2-2-9 Cuantificación de ácidos nucleicos

La calidad y cantidad del ARN y ADN extraído fueron estimadas en un gel de agarosa 1%, para lo cual se realizó una corrida electroforética corta (durante 15-20

minutos) a 100 volts de 1 µg de ARN y se visualizó en el transiluminador con luz UV. Paralelamente, se midieron por espectrofotometría (UV-1700 series; Shimadzu) las absorbancias a 260 y 280 nm. Las concentraciones se calcularon sabiendo que 1 DO_{260nm} de ADN= 50 mg/ml y 1 DO_{260nm} de ARN= 40 mg/ml, teniendo en cuenta el factor de dilución. El índice de pureza se evaluó por la relación entre las densidades ópticas obtenidas a 260nm y 280nm, cuyo coeficiente aceptable se estima entre 1,8-2,1.

2-2-10 Tratamiento con ADNsa del ARN

Par evitar que durante las reacciones de PCR se amplifique ADN co-purificado junto con el ARN, las muestras fueron tratadas con ADNsa mediante el siguiente protocolo:

Se incubaron 2 µg del ARN total con 2 µl de ADNasa RQ1 (Promega) durante 30 min a 37°C. Luego las muestras se trataron durante 10 min a 65°C con *ADNsa Stop Solution* (Promega). El ARN total purificado se almacenó a -70°C.

2-2-11 Síntesis de ADNc (Trascricpción reversa)

Se utilizaron aproximadamente 2 µg del ARN total purificado para la síntesis de ADNc por PCR reversa, utilizando la retrotranscriptasa MMLV-RT (Promega). La mezcla de reacción contenía 1 µg de oligo dT, 25 µM de mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 200 unidades de enzima y buffer de reacción (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT) en un volumen final de 25 µL.

El ARN total fue incubado con los oligo dT a 75 °C durante 5 min. Luego se llevó a cabo la retrotranscripción en un único ciclo de 60 min a 42 °C con un paso final de incubación de 15 min a 70 °C para eliminar cualquier traza de actividad de DNAsa.

El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

2-2-12 Cuantificación de la expresión génica

2-2-12-1 PCR en tiempo real (RTq-PCR)

El ADNc resultante fue usado como templado para la amplificación de genes específicos por medio del *7500 PCR Real System* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Los oligonucleotidos fueron diseñados usando el software *Primer Express 1.5* (Applied Biosystems) (Cuadro 2.2). Las reacciones de PCR fueron realizadas usando la SYBR Green Master Mix (ROCHE) con los oligonucleotidos listados más abajo a una

concentración final de 500 nM cada uno y 1,0 µl de 50% (v/v) ADNc como templado. Las condiciones de ciclado de la PCR consistieron en un paso inicial de activación de la polimerasa a 94°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 94° C durante 15 seg. y 1 min a 60° C.

2-2-12-2 PCRs semicuantitativas

La amplificación de los fragmentos de ADNc por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un ciclador (Bio-Rad gene Cyclyer) utilizando oligonucleótidos específicos para cada fragmento.

En primer lugar se realizaron reacciones control de PCR para confirmar el uso de cantidades equivalentes de ADNc molde, empleando oligonucleótidos específicos que amplifican fragmentos de aproximadamente 150 pb del gen de *UBIQUITINA (UBC)* cuya expresión es constitutiva. A continuación se realizaron reacciones de PCR semicuantitativas utilizando oligonucleótidos específicos.

La mezcla de amplificación estaba compuesta por el ADN molde correspondiente, 100 ng de cada oligonucleótido, 1 a 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, buffer Taq 1x y 2,5 U de enzima ADN Taq polimerasa (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl.

El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 20-35 ciclos de amplificación, cada uno de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a “T°C” (annealing) y “t” segundos a 72°C (extensión) y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Donde “T°C” y “t” son variables, dependiendo de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos usados en cada reacción de PCR y de la longitud del fragmento amplificado en cada caso.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa 1%.

2-2-13 Secuenciación de ADN genómico

Se utilizó el servicio de secuenciación de ADN que posee el Instituto LELAIR, utilizando oligonucleótidos (*primers*) de los extremos del gen *ICS1 (ISOCHORISMATE SYNTHASE 1)* (Cuadro 2.1) para genotipificar las mutantes *sid2.1*, las cuales tienen una mutación puntual en este gen.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>UBC</i> Fw	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTA
<i>UBC</i> Rev	TTGTGCCATTGAATTGAACCC
<i>PDF1.2</i> Fw	TTGCTGCTTTCGACGCA
<i>PDF1.2</i> Rev	TGTCCCACTTGGCTTCTCG
<i>ERF1</i> Fw	CCTCGGCGATTCTCAATTTTT
<i>ERF1</i> Rev	CCGAAAGCGACTCTTGAAGTCT
<i>ASA1</i> Fw	CGAATTCCTCAGTCATGGT
<i>ASA1</i> Rev	ATGTCTAGCGTTGGTCGTT
<i>SID2.1</i> Fw	ACCTCGAGTTCTCTATCGTACG
<i>SID2.1</i> Rev	AGCCCACAAACAGCTCCAGT

Cuadro 2.2: Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para PCR. *UBC*, *UBIQUITIN CONJUGATIN ENZYME 1*; *ERF1*, *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*; *PDF1.2*, *PLANT DEFENSIN 1.2*; *ASA1*, *ANTHRANILATE SYNTHASE1*; *SID2.1*, *ISOCHORISMATE SYNTHASE 1*.

2-2-14 Diseño de anticuerpo anti JAZ10

Se mandó a sintetizar un anticuerpo anti JAZ10, el cual se diseñó en la parte de la secuencia proteica que poseen en común las variantes de *splicing* de JAZ10.

La secuencia seleccionada fue NNSDSSAKSRSVPSTPREDQ. Tanto la síntesis del péptido como la generación del anticuerpo en conejos fue llevado a cabo por la empresa Bio-Synthesis, Inc. USA. Luego de generar el anticuerpo este fue purificado por columnas de afinidad.

A continuación se muestra la secuencia aminoacídica de la proteína JAZ10 y se resalta el sitio de reconocimiento del anticuerpo diseñado: MSKATIELDFLGLEKKQTNNAPKPKFQKFLDRRRSFRDIQGAISKIDPEIIKSLLA STG**NNSDSSAKSRSVPSTPREDQ**PQIPISPVHASLARSSSTELVSGTVPMITIFYNGS VSVFQVSRNKAGEIMKVVANEAASKKDESSMETDLS

El anticuerpo diseñado debería reconocer las 3 variantes de *splicing*, para así poder analizar la estabilidad de las mismas bajo tratamiento con RL. Pero después de numerosos intentos por ponerlo a punto no se pudo lograr.

2-2-15 Extracción de proteínas totales

Las extracciones de proteínas totales se realizaron como se detalla a continuación:

Se pulverizaron aproximadamente 50 mg de tejido en mortero con nitrógeno líquido y se transfirieron a tubos y se adicionaron 500 μ L de buffer de extracción (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 % TritonX100; 1 mM PMSF), se agitó por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min. a 4°C. Luego se toma el sobrenadante donde se encuentran las proteínas.

2-2-16 Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas de los extractos fue determinada por el método de Bradford (1976). Se usó albúmina de suero bovino para realizar una curva de calibración y las lecturas de absorbancia se hicieron a 620 nm.

2-2-17 Técnica de Western blot

Extractos proteicos fueron resueltos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10-15% de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se armaron geles desnaturalizantes (0,1% SDS) de 10 a 15% en celdas Bio-Rad 220. Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los volúmenes correspondientes de buffer de siembra 5X (0,625 M Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,5% β -mercaptoetanol; 10% de glicerol; 0,5% azul de bromofenol) y calentándolas por 3-5 min a 100°C. Como buffer de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS 1X. Se usaron marcadores de peso molecular de 10 a 170 kDa (Thermo Scientific).

Luego las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham-C). La transferencia se hizo en cuba de inmersión (Bio-Rad) utilizando Tris-glicina 1X, metanol 20% durante 1 h a 70-80 volts. Las membranas se incubaron durante 1 h con solución de bloqueo (leche descremada 5% o BSA 4% en buffer TBS-Tween) y luego con el anticuerpo anti JAZ10 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti conejo y se volvieron a lavar. Como

sustrato para la peroxidasa se usó el kit de quimioluminiscencia *Clarity ECL* (Bio-Rad). Los anticuerpos secundarios se diluyeron en leche descremada 1%.

2-2-17 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el Software INFOSTAT (Versión profesional 1.1). En los análisis de expresión génica y metabolitos secundarios los datos fueron analizados mediante el test estadístico ANOVA de dos factores, el tratamiento lumínico y la inducción con MeJA. En los bioensayos que se evaluó el área lesionada los datos fueron analizados mediante el test estadístico ANOVA de dos factores, siendo los factores el genotipo y el tratamiento lumínico. Cuando la interacción entre factores resultó significativa, la diferencia entre medias se evaluó mediante el test de comparaciones de Tukey. En algunos casos los datos tuvieron que ser transformados, con distintas funciones como \log_2 o raíz cuadrada, para que cumplan los supuestos de homocedasticidad y normalidad, se indican en los gráficos. En los bioensayos en que se evaluaron las lesiones según la clasificación de las mismas se utilizó el test estadístico Chi Cuadrado de Pearson.

CAPÍTULO 3

El *crosstalk* entre JA-SA y el efecto de las variantes de *splicing* de las proteínas represoras JAZ10 sobre la regulación negativa de la vía de JA por bajas relaciones R:RL

CAPÍTULO 3

El *crosstalk* entre JA-SA y el efecto de las variantes de *splicing* de las proteínas represoras JAZ10 sobre la regulación negativa de la vía de los tejidos a JA por bajas relaciones R:RL

3-1 INTRODUCCIÓN

En la naturaleza las plantas interactúan con una amplia gama de patógenos microbianos e insectos herbívoros así como con otras plantas de su entorno y a medida que fueron evolucionando han logrado, mediante diversos mecanismos, reconocer a sus atacantes y defenderse (Chisholm et al, 2006; Jones y Dangl, 2006). De acuerdo al estilo de vida del atacante las plantas activan un grupo de defensas específicas para combatirlos, dicha activación implica un costo ecológico (Baldwin, 2001; Cipollini, 2004; Bostock, 2005; Cipollini, 2010; Heil and Karban, 2010). La asignación de recursos a la defensa contra un tipo de atacante puede reducir su capacidad para responder al ataque de un patógeno con un estilo de vida diferente (Figura 3.1). Las plantas parecen utilizar repertorios de defensa que efectivamente se ajustan a las características de sus atacantes y así evitar un gasto de energía innecesaria.

Además de defenderse, las plantas deben crecer lo suficientemente rápido para evitar ser sombreadas por sus vecinas. Hasta el momento existe poca información acerca de cómo las plantas enfrentan el dilema de “crecer o defenderse”. Estudios recientes han demostrado que al enfrentarse a situaciones de competencia y de ataque de patógenos en forma simultánea activan la expresión del sistema SAS y no el de defensas (de Wit et al., 2013). La inactivación del phyB participa en esta regulación negativa en la respuesta de los JAs, produciendo que la planta sea más susceptible al ataque de patógenos e insectos (Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012; de Wit et al., 2013; Izaguirre et al., 2013; Kegge et al., 2013; Chico et al., 2014; Leone et al., 2014).

Las distintas señales ambientales, con frecuencia, son reguladas por un *crosstalk* entre distintas fitohormonas (Kunkel and Brooks, 2002; Bostock, 2005; Koornneef and Pieterse, 2008; Spoel and Dong, 2008; Pieterse et al., 2009; Verhage et al., 2010). Un caso bien caracterizado de *crosstalk* es la interacción antagónica entre las vías de señalización de los JAs y del SA (Kunkel and Brooks, 2002; Bostock, 2005; Pieterse et al., 2009; Thaler et al., 2012). Las plantas infectadas por patógenos biótrophos, inductores de la vía del SA, suprimen las defensas dependientes de los JAs, activada contra patógenos necrótrofos (Felton and Korth, 2000; Spoel et al., 2007). Se entiende que dan

prioridad a la inversión de recursos en la defensa dependiente del SA sobre las respuestas dependientes de los JAs. De manera similar, la activación de la vía de los JAs puede reprimir la respuesta al SA (Brooks et al., 2005; Uppalapati et al., 2007). Los mecanismos utilizados por la vía del SA para modular la respuesta a los JAs dependen principalmente de controles que tienen lugar a nivel de las interacciones entre los factores de transcripción y los genes de respuesta (Koornneef and Pieterse, 2008; Leon-Reyes et al., 2009; Pieterse et al., 2009; Verhage et al., 2010), como consecuencia pueden deprimir tanto la biosíntesis como la sensibilidad a los JAs (Spoel et al., 2003). Este *crosstalk* hormonal podría ser uno de los mecanismos utilizados por las plantas para reprimir la vía de señalización de los JAs en respuesta a bajas relaciones R:RL.

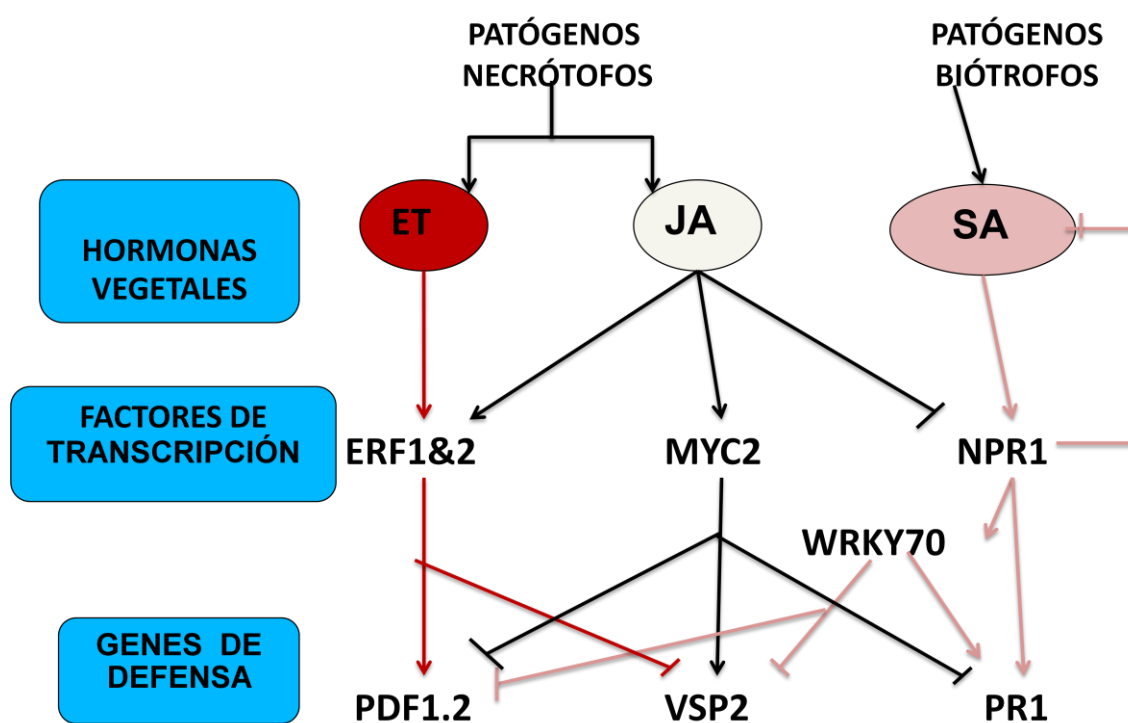


Figura 3.1: Modelo simplificado de las principales vías de señalización (ET; JA; SA) implicadas en las respuestas a estreses bióticos en *Arabidopsis*. Se muestran los principales factores de transcripción y genes involucrados en el *crosstalk* hormonal entre las tres vías de señalización. → activa; —| reprime.

Otro posible mecanismo de regulación de la respuesta al RL es a través de las proteínas JAZ, las principales represoras de la vía de los JAs. Estas proteínas (codificadas por una familia de 12 genes en *Arabidopsis*) sufren *splicing* alternativo lo que produce un número aun mayor de proteínas funcionalmente diferentes (Yan et al., 2007; Chung and Howe, 2009). La diversificación funcional por *splicing* alternativo es

un proceso fundamental para la expansión de la diversidad de proteínas y la complejidad funcional de los organismos eucariotas. Por ejemplo, los estudios en este área indican que el 95% de las transcripciones multiexon codificadas por el genoma humano sufren *splicing* alternativo (Pan et al., 2008). Aunque la comprensión de este proceso en plantas es todavía baja, cada vez existe más evidencia de que este mecanismo promueve la adaptación a distintos estrés (Reddy, 2007; Barbazuk et al., 2008).

Particularmente se ha demostrado que las proteínas JAZ10 participan en la regulación negativa de las respuestas a los JAs generada como consecuencia de bajas relaciones R:RL (Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012; Leone et al., 2014). Otros estudios han revelado que el pre-ARNm (ARN mensajero) de JAZ10 genera tres variantes de *splicing*, las cuales difieren en la secuencia de su dominio Jas, sitio donde se encuentra la secuencia de interacción con la proteína receptora COI. La proteína JAZ10.1, de longitud completa, contiene el dominio Jas intacto (Chung and Howe, 2009). Por su parte la proteína JAZ10.3 carece de siete aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio Jas. Esta variante interacciona débilmente con COI1 por lo que se degrada solo en altas concentraciones de JA-Ile. La sobreexpresión de esta variante en *A. thaliana* le confiere a estas plantas una insensibilidad parcial a los JAs (Yan et al., 2007; Chung and Howe, 2009). La tercera variante de *splicing* es la proteína JAZ10.4 la cual carece por completo del dominio Jas, situación que impide que JAZ10.4 interactúe con COI1 y que en consecuencia sea altamente resistente a la degradación aun en altas concentraciones de JA. Las plantas transgénicas que sobreexpresan esta última variante resultan altamente insensibles a los JAs. La existencia de estas tres variantes de *splicing*, que difieren en su dominio Jas, produce un aumento en la diversidad funcional de la proteína JAZ10 en *Arabidopsis*.

El objetivo de este capítulo es determinar si la de-sensibilización de los tejidos a los JAs producida por bajas relaciones R:RL en plantas de *A. thaliana* involucra la activación de elementos de la vía del SA (antagónica del JA). Por otro lado se buscó determinar el rol de las variantes de *splicing* de la proteína JAZ10 en la represión de la vía de los JAs mediada por bajas relaciones R:RL. Evaluamos los efectos de tratamientos con bajas relaciones R:RL simulando la competencia con plantas vecinas sobre la resistencia a *B. cinerea*, la inducción de genes y la producción de metabolitos secundarios de defensa. Investigamos además la existencia de un paralelismo entre la

acción antagonista del SA y de bajas relaciones R:RL sobre la represión de la respuesta mediada por el JA.

3-2 RESULTADOS

3-2-1 Las bajas relaciones R:RL reprimen la inducción de defensas mediadas por la vía de señalización de los JAs

Como se mencionó anteriormente, los patógenos necrótrofos e insectos herbívoros comúnmente activan respuestas de defensa que involucran la vía de señalización de los JAs. Para comprender mejor el efecto de las bajas relaciones R:RL sobre esta vía se diseñaron experimentos en plantas des-etioladas de *A. thaliana* cultivadas en una mezcla de perlita- vermiculita- turba (1:1:1) durante 2-3 semanas. El tratamiento de RL se realizó suplementando la luz blanca con radiación RL aplicada lateralmente, sin alterar los niveles de luz PAR pero sí la relación R:RL simulando la presencia de plantas vecinas (Izaguirre et al., 2006; Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012; Izaguirre et al., 2013). Luego se realizaron tratamientos con una solución de MeJA 200 μ M o se inocularon las hojas con un solución con 5×10^5 esporas/ml de *B. cinerea* (ver materiales y métodos).

A las 3 h de la aplicación de MeJA se cosecharon plantas para medir la expresión génica mientras que a las 72 h se cosecharon plantas para cuantificar compuestos fenólicos solubles y antocianinas. En el caso de las plantas a las que se inocularon esporas de *B. cinerea* se analizaron las lesiones en las hojas a las 48-72 h de infectadas.

Como resultados del análisis de expresión de genes marcadores de la vía de los JAs se encontró que en condiciones normales (control), la baja relación R:RL no produjo ningún cambio en la expresión de los genes marcadores de la vía de los JAs, como son *ERF1*, *PDF1.2* y *ASA1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE1*). Cuando las plantas fueron rociadas con MeJA se produjo un aumento en la expresión de estos genes en luz ambiente, como era de esperarse y este aumento estuvo reprimido en las plantas que fueron tratadas con RL (Figura 3.2).

Cuando se procedió al análisis de los metabolitos secundarios se advirtió que la aplicación de MeJA indujo la acumulación tanto de los compuestos fenólicos solubles como de antocianinas y que este efecto del MeJA fue reprimido por el tratamiento con RL. El contenido total de estos metabolitos no se vio afectado por el tratamiento con RL cuando no hubo aplicación de MeJA (Figura 3.3).

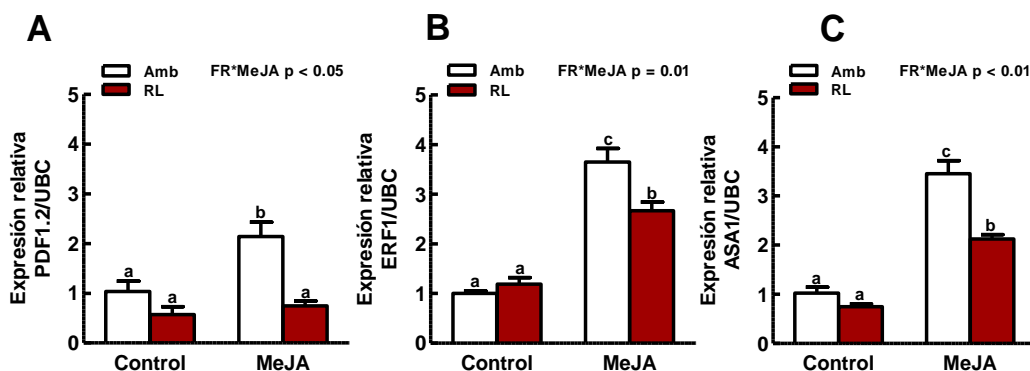


Figura 3.2: La inactivación del fitocromo por el tratamiento con radiación RL reduce la expresión de genes marcadores de la respuesta a los JAs. La expresión de los genes fue medida luego de 3h de rociar las plantas de *A. thaliana* (ecotipo salvaje Col-0) de 3 semanas de edad, con una solución de MeJA (200 μ M). Los niveles de expresión fueron relativizados al control en luz ambiente (Col-0) y al gen de expresión constitutiva *UBC* (*UBIQUITINA*). Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL. La barra de error, representa al error estándar (n=3 réplicas). En cada panel, las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. **A)** efecto de MeJA y RL sobre la expresión de *PDF1.2*. **B)** efecto de MeJA y RL sobre la expresión de *ERF1*. **C)** efecto de MeJA y RL sobre la expresión de *ASA1*.

En los bioensayos se encontró que los tratamientos con RL incrementan la capacidad de *B. cinerea* de infectar las hojas. Cuando se clasificaron las lesiones según la escala cuantitativa (Figura 3.4), en bioensayos cosechados a las 48 h post-inoculación de las esporas, las plantas en tratamiento con RL presentaron un incremento en las lesiones de tipo III y IV (Figura 3.4A) respecto a las infectadas en luz blanca. Por su parte, cuando se cuantificaron las áreas infectadas, a las 72 h post-inoculación, se encontró que las plantas en tratamiento con RL las áreas infectadas eran significativamente mayores a las de las plantas en luz blanca (Figura 3.4B). También se analizó el comportamiento de mutantes de *phyB*, las cuales al poseer el fitocromo B mutado se comportan de manera similar a plantas expuestas a RL de manera continua. En estos bioensayos se encontró que en las mutantes las lesiones provocadas tanto en luz ambiente como en tratamiento con RL fueron equivalentes a las observadas en Col-0 en tratamiento con RL.

Estos resultados en conjunto demuestran que la inactivación del phyB por bajas relaciones R:RL o por mutación reprime la vía señalización de los JAs en plantas de *A. thaliana* haciéndolas más sensibles al ataque de *B. cinerea*.

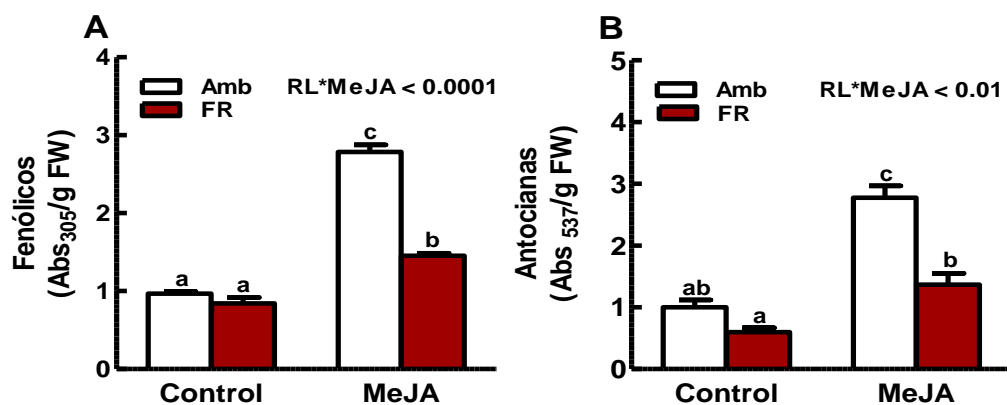


Figura 3.3: La inactivación del fitocromo por radiación RL reduce la acumulación de compuestos fenólicos solubles y antocianinas en hojas. La acumulación de estos metabolitos fue medida a las 72 h luego de rociar las plantas de *A. thaliana* de 3 semanas de edad con una solución de MeJA 200 μ M. Los niveles de acumulación están expresados de manera relativa a los niveles del ecotipo salvaje (Col-0) en condiciones de luz ambiente (control). Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL. Las barras de error representa al error estándar (n=4 réplicas). En cada panel las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos **A)** efecto de MeJA y RL sobre la acumulación de compuestos fenólicos solubles en hojas **B)** efecto de MeJA y RL sobre la acumulación de antocianinas.

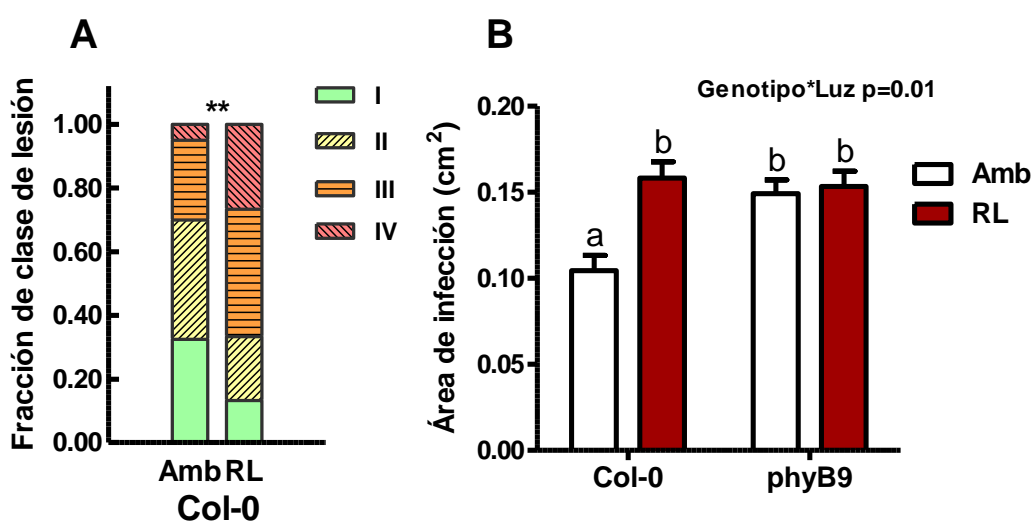


Figura 3.4: La inactivación del fitocromo por el tratamiento con radiación RL reduce la resistencia de plantas de *A. thaliana* a la infección por *B. cinerea*. Hojas de *A. thaliana* ecotipo salvaje (Col-0) de 3 semanas de edad fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea*. Am, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL **A)** las lesiones se clasificaron a las 48 hs según el tipo lesión en I, lesión no visible; II, lesión no expandida; III, lesión expandida menor al 30% de la hoja; IV, lesión expandida de más del 30% de la hoja, con síntomas de clorosis y hoja colapsada. Se realizó un análisis de CHI cuadrado entre los tratamientos, ** indica diferencias significativas, $P < 0,01$ **B)** se cuantificaron las áreas de las lesiones producidas por el hongo a las 72 h de la inoculación del hongo en Col-0 y en mutantes de *phyB*. Las barras de error representan al error estándar (n=6 réplicas).

3-2-2 La represión a la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL es independiente de la vía del SA

El SA es la hormona más caracterizada como represora de la vía de los JAs en *A. thaliana* (Pieterse et al., 2009) y tiene efectos semejantes a los de bajas relaciones R:RL sobre la expresión de genes marcadores de respuesta a los JAs (Spoel et al., 2003; Koornneef et al., 2008; Van der Does et al., 2013). De aquí surge la hipótesis de que el RL reprime la vía de los JAs utilizando elementos de la vía del SA, y por lo tanto se espera que en las mutantes de la vía del SA sometidas a bajas relaciones R:RL no se produzca una disminución de las defensas inducidas por los JAs. Para comprobarlo se analizó el efecto represor del RL sobre la respuesta a los JAs en mutantes (*sid2.1* y *npr1*) con deficiencias en la vía del SA. Las mutantes *sid2.1* también conocidas como *ics1* (Nawrath and Métraux, 1999) son deficientes en la enzima ISOCORISMATO SINTASA 1, la cual es esencial para la producción de SA, la inducción de *PR1* y en consecuencia en la generación de una respuesta local y sistémica de resistencia en *A. thaliana* (Wildermuth et al., 2001). Las mutantes *npr1* carecen de la proteína NPR1, crítica en la gran mayoría de las respuestas inducidas por el SA (Dong, 2004) incluyendo el efecto antagónico entre la señalización del SA y de los JAs (Spoel et al., 2003; Leon-Reyes et al., 2009).

Se puso a prueba esta hipótesis realizando experimentos en los cuales se midió la expresión del gen *PDF1.2* en las mutantes *sid2.1* en respuesta a la aplicación de MeJA en condiciones de luz ambiente (luz blanca) y bajo tratamiento con RL. Se encontró que al igual que en el ecotipo salvaje (Col-0), en las mutantes *sid2.1* aumenta la expresión de *PDF1.2* en respuesta a MeJA en luz ambiente y reprimiendo esta respuesta cuando recibieron RL suplementario (Figura 3.5).

A continuación, se cuantificó la acumulación de los metabolitos secundarios, antocianinas y compuestos fenólicos solubles, tanto en las mutantes *sid2.1* como en las *npr1* (figura 3.6). Ambas respondieron de igual manera que las Col-0, aumentando la acumulación de estos metabolitos en respuesta a MeJA en condiciones de luz ambiente, y reprimiendo esta respuesta al ser irradiadas con RL.

Posteriormente, se testeó si el RL tenía efectos sobre la susceptibilidad a la infección de *B. cinerea* en las mutantes de la vía del SA. En los bioensayos realizados se encontró que las mutantes *sid2.1* y *npr1* tuvieron un comportamiento semejante al de las Col-0, estando completamente conservado el efecto del RL sobre la susceptibilidad al patógeno (Figura 3.7).

Sobre la base de estos resultados, concluimos que el efecto antagónico del RL sobre la vía de los JAs no depende de la activación de la vía de SA.

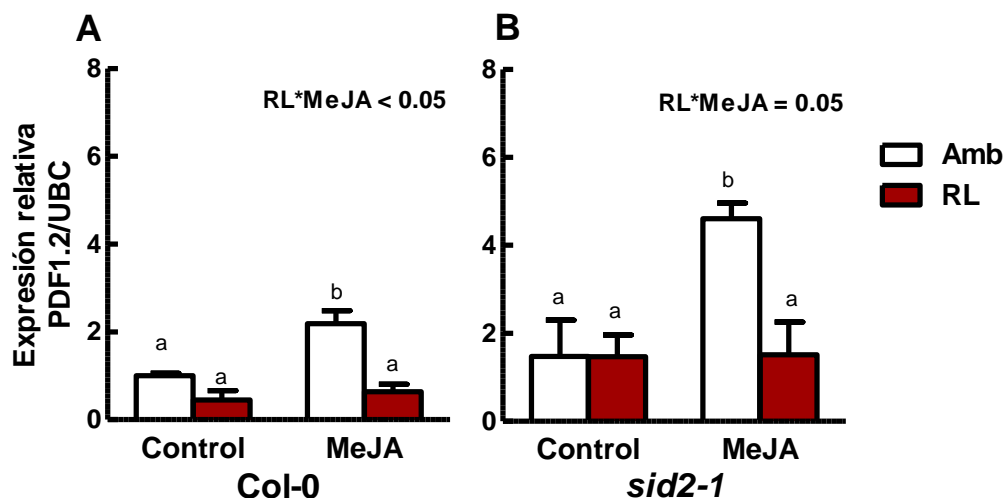


Figura 3.5: Los efectos del RL reduciendo la expresión del gen *PDF1.2* se encuentran conservados en las mutantes de la vía del SA, *sid2-1*. La expresión fue cuantificada a las 6 h de rociar plantas de 3 semanas con una solución de MeJA 200 μ M. Los niveles de expresión están expresados de manera relativa a los niveles en *Col-0* control en condiciones de luz ambiente y al gen de expresión constitutiva *UBC* (*UBIQUITINA*). Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL. Las barras de error representan al error estándar (n=4 réplicas). En cada panel, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos **A)** efectos de MeJA y RL sobre la expresión de *PDF1.2* en *Col-0* **B)** efectos de MeJA y RL sobre la expresión de *PDF1.2* en mutantes *sid2.1*.

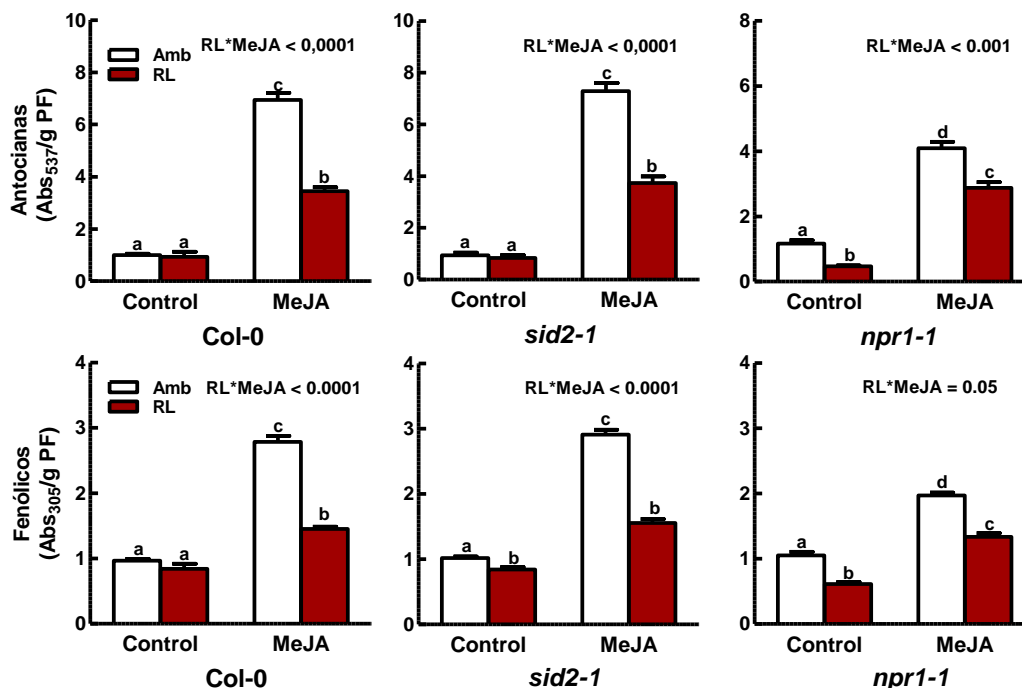


Figura 3.6: Los efectos del RL reduciendo la acumulación de compuestos fenólicos solubles y antocianinas se encuentran conservados en las mutantes *sid2-1* y *npr1-1* de la vía del SA. La acumulación de estos metabolitos fue medida a las 72 h luego de rociar plantas de 3 semanas de edad, cultivadas en sustrato, con una solución de MeJA 200 μ M. Los niveles de acumulación están expresados en relación a los del ecotipo salvaje Col-0 en condiciones de luz ambiente. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL; PF, peso fresco; Abs305, absorbancia a 305nm; Abs537, absorbancia a 537nm. Las barras de error representan al error estándar (n=3 réplicas). En cada panel, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

3-2-3 Las bajas relaciones R:RL reprimen la vía de los JAs a nivel del módulo de percepción del JA por el complejo proteico SCF^{COI1}-JAZ

Se ha reportado que el efecto represor del SA sobre la vía de señalización de los JAs ocurre río abajo de SCF^{COI1}-JAZ (Van der Does et al., 2013), por lo tanto, se propuso comprobar si la de-sensibilización de los tejidos a los JAs por tratamientos con RL ocurre al mismo nivel que la ocasionada por el SA.

A tal efecto se realizaron experimentos para cuantificar la expresión génica en plantas sobreexpresantes del FT *ERF1* y mutantes de *coil* (*35S::ERF1/coil-1*), utilizándose como controles Col-0 y sobreexpresantes de *ERF1* (*35S::ERF1/COI1*).

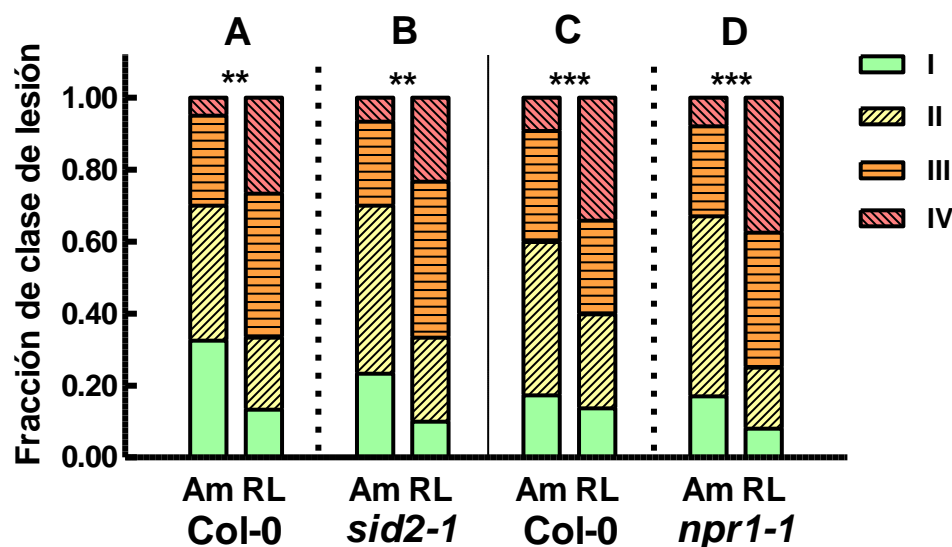


Figure 3.7: El efecto de la inactivación del phyB por radiación RL sobre la resistencia de plantas de *A. thaliana* a la infección por *B. cinerea* es independiente de la vía de señalización del SA. Hojas de *A. thaliana* ecotipo salvaje (Col-0) de 3 semanas de edad fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea*. Las lesiones se clasificaron a las 48 h según su tipo, I lesión no visible; II, lesión no expandida; III, lesión expandida menor al 30% de la hoja; IV, lesión expandida de más del 30% de la hoja, con síntomas de clorosis y/o hoja colapsada. Se realizó un análisis de CHI cuadrado entre los tratamientos, ** indica diferencias significativas $P < 0.01$; ***, indica diferencias significativas $P < 0.001$; Am, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL A y C) efecto del RL en el ecotipo salvaje Col-0 B) efecto del RL en mutantes *sid2-1*, deficientes en la enzima ISOCORISMATO SINTASA 1 D) efecto del RL en mutantes *npr1-1*, deficientes en la vía de señalización del SA.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: en las líneas *35S::ERF1/coi1-1* la expresión de *PDF1.2* se encontraba constitutivamente elevada debido a la sobreexpresión del FT *ERF1* (Figura 3.8). Cuando estas plantas fueron inducidas con MeJA no aumentó la expresión de *PDF1.2* (debido a la ausencia de *COI1*) y cuando se las trató con RL no se produjo una represión en la expresión de *PDF1.2* (Figura 3.8). Este resultado sugiere que, a diferencia de lo que ocurre con el SA, el RL es incapaz de reprimir la respuesta a JA río debajo de *COI1*-JAZ. También se observó que el tratamiento con RL deprime la expresión de *PDF1.2* cuando se utilizaron las plantas transgénicas *35S::ERF1/COI1*. Esto último indica que la pérdida de la represión que ocurre en las mutantes *35S::ERF1/coi1-1* en tratamiento con RL no es una consecuencia de la fuerte activación de *ERF1* por el promotor 35S. Por lo tanto, el efecto del RL reprimiendo la expresión del gen *PDF1.2* requiere que el complejo proteico SCF^{COI1} -JAZ de percepción del JA-Ile sea funcional.

Estos resultados, en conjunto, demuestran que la represión producida por el SA y por las bajas relaciones R:RL sobre las respuestas de defensa mediadas por los JAs se lleva a cabo por dos vías diferentes. Por un lado, las mutantes de la vía del SA responden de igual modo que los controles en todos los análisis realizados y, por el otro, el efecto antagónico del SA sobre la vía de los JAs ocurre río abajo de SCF^{COI1}-JAZ (Van der Does et al., 2013), mientras que la represión por bajas relaciones R:RL ocurre a nivel del módulo de percepción, SCF^{COI1}-JAZ.

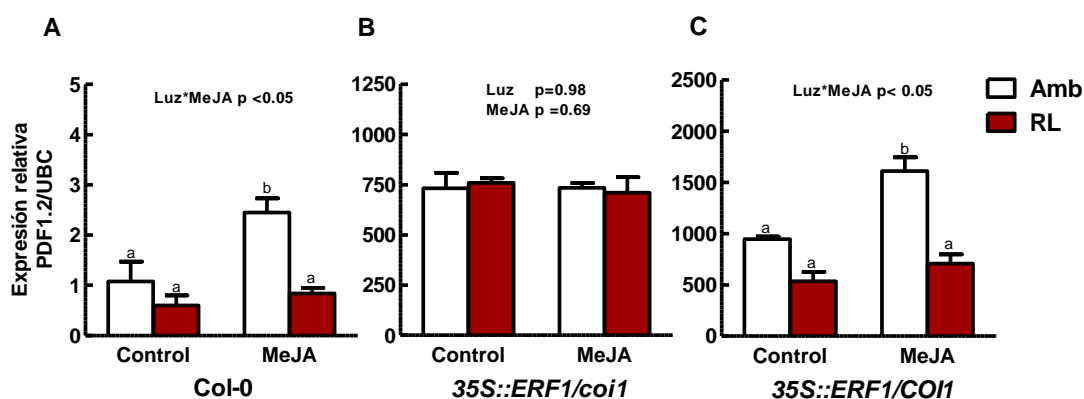


Figura 3.8: La represión en la expresión de *PDF1.2* producida por bajas relaciones R:RL requiere de COI1. La expresión fue cuantificada a las 6 h de rociar plantas de 3 semanas con una solución MeJA200 μ M. Los niveles de expresión están relativizados a los niveles en Col-0, control en condiciones de luz ambiente y al gen de expresión constitutiva *UBC* (*UBIQUITINA*). Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL. Las barras de error representan al error estándar (n=4 réplicas). En cada panel, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos **A)** Efectos de MeJA y FR sobre la expresión de *PDF1.2* en Col-0 **B)** Efectos de MeJA y FR sobre la expresión de *PDF1.2* en 35S::ERF1-*coi1-1* **C)** Efectos de MeJA y FR sobre la expresión de *PDF1.2* en 35S::ERF1-COI1.

3-2-4 La proteína JAZ10 es requerida para la sensibilización de *A. thaliana* frente a *B. cinerea* causada por bajas relaciones R:RL

Trabajos previos realizados en este laboratorio (Moreno et al., 2009) demostraron que la expresión de *JAZ10* se encuentra inducida en tratamientos con RL y recientemente se encontró que plantas mutantes de *jaz10* son más susceptibles a la bacteria biótrofa *Pseudomonas syringae* cepa DC3000 que Col-0 (Demianski et al., 2012).

Para determinar si la proteína JAZ10 participa de la represión de la vía de los JAs ocasionada por bajas relaciones R:RL se realizaron bioensayos con el hongo necrótrofo *B. cinerea* en las mutantes *jaz10.1*. Se encontró que las mutantes *jaz10.1* presentaban una sensibilidad similar a las Col-0 en luz ambiente y que en el tratamiento con RL no

se produjo un aumento en la infección como sí ocurrió en las Col-0 (Figura 3.9). Por lo tanto, en estas mutantes se pierde el efecto del RL como causante de un aumento de la susceptibilidad a la infección de *B. cinerea*.

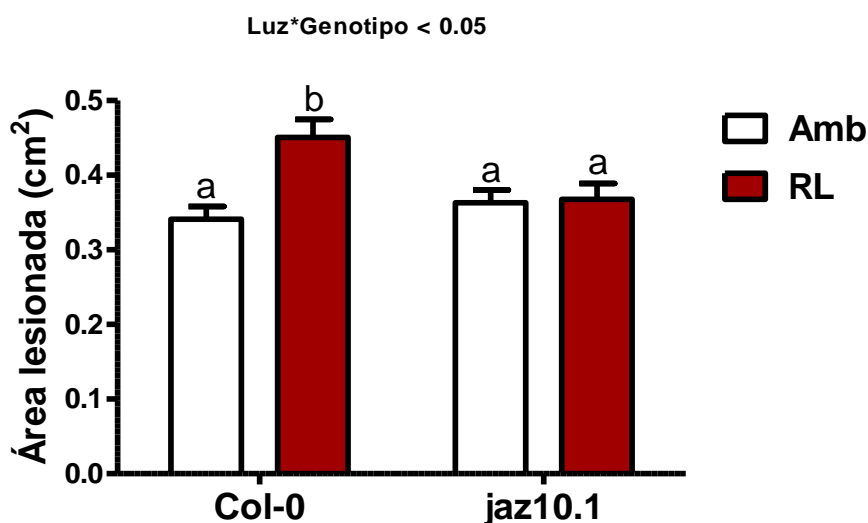


Figura 3.9: JAZ10 es necesario para que la inactivación del phyB por radiación RL produzca una disminución en la resistencia de *A. thaliana* a la infección por *B. cinerea*. Hojas de *A. thaliana* ecotipo salvaje (Col-0) de 3 semanas de edad fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea*. Los análisis se realizaron a las 72 h de la inoculación con el hongo. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL; jaz10.1, mutantes de JAZ10. Las barras de error representan al error estándar (n=6 réplicas). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos y ó genotipos.

Luego de determinar que la proteína JAZ10 participaría de la represión producida por el RL sobre la vía de los JAs y sabiendo que esta proteína produce tres variantes de *splicing* con distinta sensibilidad a los JAs (Yan et al., 2007; Chung and Howe, 2009), se propuso determinar si alguna de estas variantes en particular es requerida para el efecto del RL aumentando la susceptibilidad a *B. cinerea*. Para esto se contaba con plantas mutantes *jaz10* a las cuales se las suplementó con cada una de las variantes. Para lograr estas líneas a las mutantes *jaz10* se les adicionó un *cassette* que contenía al promotor de JAZ10 salvaje y a cada una de las variantes de *splicing*, *jaz10/PJAZ10::JAZ10.1*; *jaz10/PJAZ10::JAZ10.3*; *jaz10/PJAZ10::JAZ10.4*. Estas líneas fueron generadas por el grupo del Dr. Gregg Howe (Michigan State University). Con estas líneas se realizaron bioensayos para determinar si alguna de las variantes de *splicing* complementaba al mutante *jaz10*, restituyendo el efecto del tratamiento con RL sobre la susceptibilidad a *B. cinerea*.

Se encontró que en las líneas suplementadas con *JAZ10.4* (*jaz10/PJAZ10::JAZ10.4*) se recuperaba el efecto del RL aumentando la susceptibilidad a la infección de *B. cinerea* (Figura 3.10-C). En cambio las suplementadas con *JAZ10.1* (*jaz10/PJAZ10::JAZ10.1*) y *JAZ10.3* (*jaz10/PJAZ10::JAZ10.3*) respondieron igual que las mutantes *jaz10.1* (Figura 3.10-A y B); por lo tanto, suplementaciones con *JAZ10.1* o *JAZ10.3* no tuvieron efecto sobre la sensibilización de las plantas a la infección de *B. cinerea* por tratamientos con RL.

Los resultados presentados en esta sección demuestran que JAZ10 participa en la disminución de la resistencia de *A. thaliana* a la infección por el hongo necrótrofo *B. cinerea* producida por tratamientos con RL y sugieren que la variante de *splicing* *JAZ10.4* jugaría un papel importante en este efecto.

3-3 DISCUSIÓN

Las plantas que crecen en alta densidad, tanto en ambientes naturales como en agrícolas, tienen un alto riesgo de ser sombreadas por la vegetación que las rodea. Durante la evolución se han desarrollado una variedad de respuestas plásticas que les permiten sobrevivir a condiciones adversas. Uno de estos mecanismos es la detección de plantas vecinas percibiendo cambios en el espectro lumínico a través de los phys, que desencadena cambios morfológicos que evitan el sombreado. Al mismo tiempo, las plantas se encuentran expuestas a un gran número de patógenos que tratan de alimentarse de ellas pero a través de distintas respuestas de defensa logran sobrevivir a la gran mayoría de estos ataques. Es así que en la naturaleza las plantas se enfrentan a múltiples estrés en forma simultánea, lo que genera oportunidades para el *crosstalk* entre las distintas vías de señalización. Sin embargo, la naturaleza de este *crosstalk* y su significado adaptativo está lejos de haber sido dilucidado.

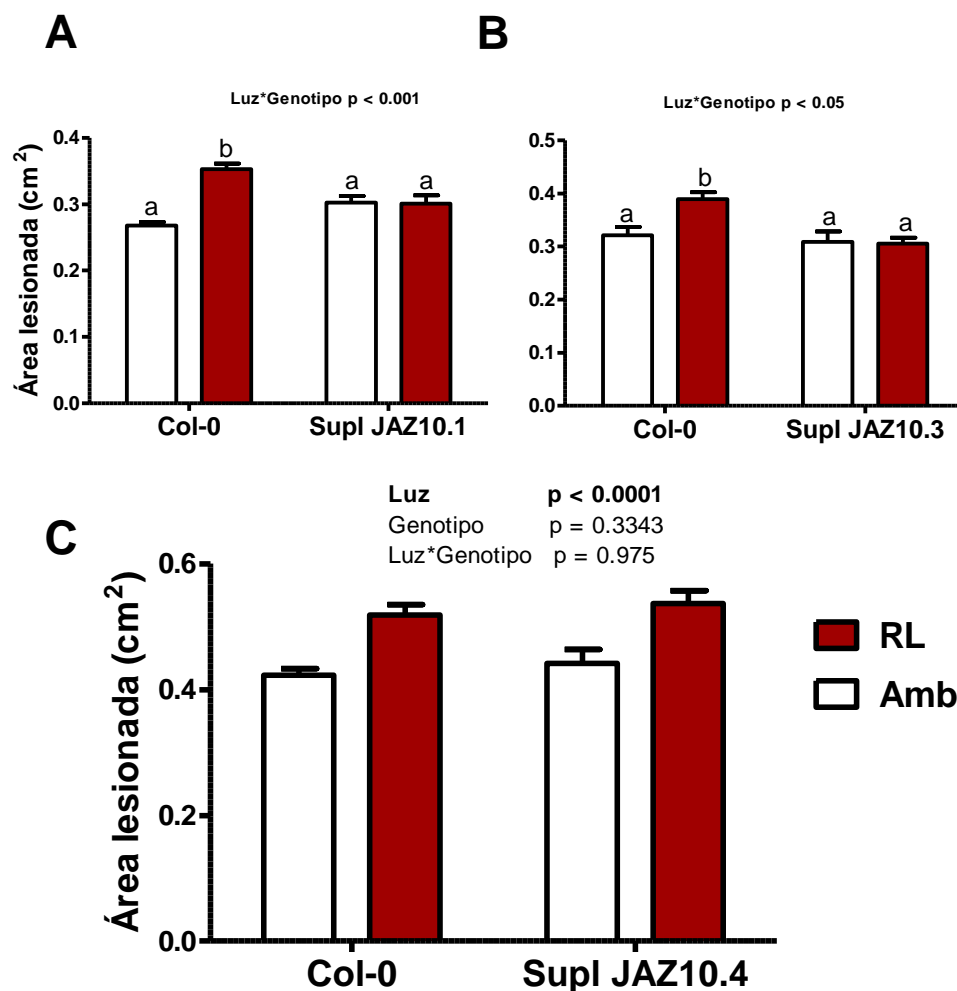


Figura 3.10: La variante de *splicing* de JAZ10, JAZ10.4 participa en la disminución en la resistencia de *A. thaliana* a la infección por *B. cinerea* producida por la inactivación del phyB por RL. Los bioensayos se realizaron en plantas de *A. thaliana* de 3 semanas de edad a las cuales se les inocularon las esporas de *B. cinerea* en sus hojas. Los análisis se realizaron a las 72 h de la inoculación del hongo. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL; Supl JAZ10.1, mutantes *jaz10* suplementadas con JAZ10.1; Supl JAZ10.3, mutantes *jaz10* suplementadas con JAZ10.3; Supl JAZ10.4, mutantes *jaz10* suplementadas con JAZ10.4. Las barras de error representan al error estándar (n=6 réplicas). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos y ó genotipos **A)** efecto de RL sobre la infección de *B. cinerea* en Col-0 y en mutantes *jaz10* suplementadas con JAZ10.1 **B)** efecto de RL sobre la infección de *B. cinerea* en Col-0 y en mutantes *jaz10* suplementadas con JAZ10.3 **C)** efecto de RL sobre la infección de *B. cinerea* en Col-0 y en mutantes *jaz10* suplementadas con JAZ10.4.

3-3-1 La proximidad de plantas vecinas reprime las respuestas de defensas mediadas por los JAs a través de la inactivación de phyB

Desde el punto de vista ecológico, los efectos de la densidad de plantas sobre la vulnerabilidad podrían enmarcarse funcionalmente en el paradigma de los compromisos

en la asignación de recursos (por ej. priorizar la asignación de recursos a competencia por sobre la asignación a defensa). Desde el punto de vista agronómico, reviste interés en el contexto de la depresión del sistema de defensa en cultivos sembrados a alta densidad (Burdon and Chilvers, 1982). A pesar de ser altamente importante, el mecanismo por el cual la proximidad de plantas vecinas afecta la susceptibilidad de las plantas a enfermedades no ha sido debidamente aclarado.

Los resultados aquí presentados demuestran que bajas relaciones R:RL dentro de un canopeo tienen un efecto negativo sobre la sensibilidad de las plantas al ataque del patógeno necrótrofo *B. cinerea*. Estos resultados en conjunto con otros obtenidos en este laboratorio, sugieren que mediante algún mecanismo el phyB regula positivamente la vía de señalización de los JAs y por lo tanto la respuesta inmune de las plantas.

En este trabajo se demostró que la inactivación de los fitocromos por exposición de las plantas a bajas relaciones R:RL tiene un efecto negativo sobre la expresión de genes (Figuras 3.2; 3.5; 3.8) y la acumulación de metabolitos de defensa (Figuras 3.3; 3.6) en *A. thaliana* cuando son inducidas con MeJA. Por otro lado se ha reportado que este efecto negativo sobre la expresión de genes es similar cuando las defensas son inducidas por el patógeno necrótrofo *B. cinerea* (Cerrudo et al., 2012). También se ha demostrado que esta señal de competencia produce una disminución en la resistencia al ataque de *B. cinerea* (Figuras 3.4; 3.7; 3.9; 3.10) y determinamos que las plantas mutantes del *phyB* responden de igual manera que las irradiadas con RL, respecto a la sensibilidad a la infección de *B. cinerea* (Figura 3.2). Estos resultados son soportados por trabajos recientes en los cuales se muestra que las plantas expuestas a bajas relaciones R:RL al igual que las mutantes de *phyB* son menos resistentes al ataque de insectos herbívoros (McGuire and Agrawal, 2005; Izaguirre et al., 2006; Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012; de Wit et al., 2013). En conjunto, afirman que la proximidad de plantas vecinas, ejerce un efecto negativo sobre las señales de defensa mediadas por los JAs a través de la inactivación del phyB. Recientemente se ha revelado que las plantas de *Arabidopsis* priorizan la expresión del fenotipo SAS sobre la expresión del sistema de defensas cuando son expuestas a ambos factores en forma simultánea: competencia y patógenos (de Wit et al., 2013). Por lo tanto, en el marco del dilema de las plantas (“crecer o defenderse”) parecería que plantas intolerantes a la sombra (como *Arabidopsis*) priorizan la asignación de recursos al crecimiento cuando detectan un alto riesgo de competencia.

La inactivación de *phyB*, por bajas relaciones RL, tiene ciertos efectos sobre la morfología de las plantas conocidos como fenotipo SAS (Franklin, 2008; Ballaré, 2009). Se podría plantear que la disminución de la expresión de defensas se debe a una relocalización de recursos hacia crecimiento y no hacia defensas o que las defensas están siendo reprimidas por algún otro mecanismo. Distintos trabajos han demostrado que la expresión del fenotipo SAS no tiene efectos sobre la regulación negativa de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL (Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012; Leone et al., 2014). Estos estudios se llevaron a cabo utilizando mutantes *sav3-2*, las cuales son deficientes en la biosíntesis de auxinas, que son esenciales para la expresión del fenotipo SAS (Tao et al., 2008), sin embargo, se determinó que presentan una respuesta normal a bajas relaciones R:RL en la expresión de respuestas de defensas (Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012; Leone et al., 2014). También se realizaron estudios de resistencia a *B. cinerea* donde en lugar de usar mutantes del *phyB* se utilizaron mutantes del *criptocromo 1* (*cry1*) (Cerrudo et al., 2012) las cuales presentan un fenotipo SAS constitutivo (Sellaro et al., 2010; Keller et al., 2011; Keuskamp et al., 2011). Ni estas mutantes ni las plantas del genotipo salvaje cultivadas bajo tratamiento que atenúan el nivel de luz azul (para inactivar *cry1*) mostraron un aumento en su sensibilidad a la infección de *B. cinerea* (Cerrudo et al., 2012).

Estos resultados, en conjunto, demuestran que la regulación negativa de la vía de señalización de los JAs por bajas relaciones R:RL está mediada por el *phyB* y que no posee una relación directa con los cambios morfológicos característicos del fenotipo SAS.

3-3-2 La atenuación de las respuesta a los JAs por señales de competencia es independiente de la vía del SA

Las respuestas a los JAs son comúnmente deprimidas por el SA, este antagonismo entre estas dos vías de señalización es uno de los casos de *crosstalk* hormonal de las plantas más estudiados (Kunkel and Brooks, 2002; Bostock, 2005; Lorenzo and Solano, 2005; Koornneef and Pieterse, 2008; Pieterse et al., 2009; Pieterse et al., 2012; Van der Does et al., 2013). Se han encontrado numerosos insectos herbívoros (Stotz et al., 2002; Cipollini et al., 2004; Rayapuram and Baldwin, 2007; Zarate et al., 2007; Weech et al., 2008; Diezel et al., 2009) y patógenos (Preston et al., 1999) incluyendo algunas cepas de *B. cinerea* (El Oirdi et al., 2011) que tienen la capacidad de activar la vía de señalización del SA (respuesta defensiva efectiva contra patógenos biótrofes) y de esta

manera reprimir las respuestas a los JAs activadas por la planta (efectiva contra ellos). Estudios previos han demostrado que dobles mutantes *phyA-phyB* tienen alteradas algunas de las respuestas al SA (Genoud et al., 2002; Griebel and Zeier, 2008) y también se ha observado que bajas relaciones R:RL producen un incremento en la acumulación de SA (Kurepin et al., 2010). En esta tesis se aportan evidencias que indica que la inactivación del phyB por bajas relaciones R:RL reprime la vía de señalización de los JAs mediante un mecanismo distinto al utilizado por el SA. Los resultados indican que las mutantes de la vía del SA, *npr1* y *sid2.1*, conservan las respuestas al tratamiento de RL deprimiendo la expresión del gen *PDF1.2* (Figura 3.5); la acumulación de metabolitos secundarios, como los fenólicos solubles y las antocianinas (Figura 3.6); así como la resistencia a la infección de *B. cinerea* (Figura 3.7).

3-3-3 La regulación negativa de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL ocurre a un nivel diferente de la producida por el SA

El efecto antagónico del SA sobre la vía de los JAs ocurre río abajo del complejo SCF^{COI1}-JAZ de percepción de JA-Ile (Van der Does et al., 2013). Los resultados de esta tesis sugieren que el efecto de la inactivación de phyB sobre la respuesta a los JAs no ocurre río debajo de COI1. COI1 pertenece al complejo proteico (SCF^{COI1}) que en presencia de JA-Ile se une a las proteínas JAZ, las ubiquitina y son enviadas a degradación por el proteosoma 26S, desreprimiendo la vía de señalización de los JAs. Hemos demostrado por aproximaciones genéticas utilizando mutantes *coil* y *jaz10*, que tanto COI1 como JAZ10 son necesarios para que se produzca la represión producida por bajas relaciones R:RL (Figura 3.8 y 3.9). Esto significa que la represión de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL y la generada por el SA ocurre a distintos niveles: la primera a nivel del módulo de percepción de los JAs por SCF^{COI1}-JAZ y la otra río abajo del mismo.

3-3-4 La proteína JAZ10 participa de la regulación negativa de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL

Un posible mecanismo es que las bajas relaciones R:RL produzcan cambios en la expresión de las proteínas JAZ y o en la estabilidad de las mismas. Se ha reportado que la expresión de ciertas JAZ se ve incrementada por bajas relaciones R:RL. Dentro de este grupo se encuentra JAZ10 (Moreno et al., 2009). El gen que codifica para esta proteína puede generar mediante *splicing* alternativo distintas proteínas con distintas

sensibilidades al JA (Chung and Howe, 2009; Chung et al., 2010; Howe, 2010) y por lo tanto distintos grados de supresión de esta vía. Aquí se ha demostrado mediante bioensayos con *B. cinerea* que la variante de *splicing* JAZ10.4 mediaría el efecto de las bajas relaciones R:RL sobre la represión de la respuesta a los JAs. Se encontró que si se suplementan mutantes *jaz10* con la variante de *splicing* JAZ10.4 (Figura 3.10) las plantas complementadas responden al tratamiento con RL de manera similar a las Col-0, cosa que no ocurrió en las plantas suplementadas con las variantes JAZ10.1 o JAZ10.3 (Figura 3.10). También se ha demostrado que la proteína JAZ10 aumenta su estabilidad en plantas expuestas a RL y en el fondo mutante *phyB* (Leone et al., 2014). Por lo tanto, se podría postular que uno de los posibles mecanismos mediante los cuales las bajas relaciones R:RL reprimen la respuesta de la vía de los JAs está dado por un aumento en la estabilidad de la proteína JAZ10, así como por un aumento en las variantes de *splicing* de JAZ10 más resistentes a ser degradadas por el JA, como por ejemplo JAZ10.4.

3-4 CONCLUSIONES

En este capítulo se demostró por aproximaciones tanto genéticas como fisiológicas que la simulación de la presencia de plantas vecinas al disminuir la relación R:RL reprime la activación de defensas dependientes de los JAs. También se demostró que este proceso ocurre en mutantes de la vía del SA, por lo que esta represión no utilizaría elementos de esta vía para reprimir la vía de los JAs. Complementariamente se demostró que, a diferencia del efecto antagónico del SA sobre la vía de los JAs, la represión producida por tratamientos con RL ocurre a nivel del módulo SCF^{COI1}-JAZ de percepción de JA-Ile.

Por último demostramos que la proteína JAZ10 participa de esta represión de la respuesta de los JAs y que la variante de *splicing* JAZ10.4 es suficiente para devolver el efecto de RL disminuyendo la resistencia a la infección de *B. cinerea* al mutante *jaz10* de *A. thaliana*.

CAPÍTULO 4

El *crosstalk* entre JA-GA no participa en la represión de las respuestas a JA producida por bajas relaciones R:RL

CAPÍTULO 4

El *crosstalk* entre JA-GA no participa en la represión de las respuestas a JA producida por bajas relaciones R:RL

4-1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas DELLA desempeñan un rol en la integración de las respuestas de las plantas sometidas a diferentes señales, sean éstas hormonales como ambientales (Achard et al., 2003; Fu and Harberd, 2003; Bolle, 2004; Achard P et al., 2006; Achard et al., 2008; de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Bai et al., 2012). Hallazgos recientes han revelado que la vía de señalización de las GAs, que es regulada negativamente por las proteínas DELLA participa en la defensa a estrés biótico, a través de la interacción con la vía de señalización de los JAs (Hou et al., 2008; Navarro et al., 2008; Cheng et al., 2009; Wild et al., 2012; Yang et al., 2012). Además se ha encontrado que plantas mutantes de proteínas DELLA muestran una sensibilidad reducida a los JAs, mientras que la activación constitutiva de una de las proteínas DELLA (*gai-1*, es una mutante insensible a las GAs) presenta mayor sensibilidad a los JAs. Ésto indica que las proteínas DELLA interactúan positivamente con la vía de los JA (Navarro et al., 2008).

Las proteínas DELLA son en la vía de señalización de las GAs funcionalmente equivalentes a las JAZ para la vía de señalización de los JAs. Se encuentran unidas a FTs, entre ellos los PIF, impidiendo la expresión de genes que controlan la elongación celular (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). A medida que la relación R:RL del ambiente disminuye, la degradación de las proteínas DELLA aumenta (Djakovic-Petrovic et al., 2007; Leone et al., 2014), de esta forma, los FT PIF quedan liberados para iniciar las respuestas de elongación celular. En períodos prolongados de exposición a bajas relaciones R:RL se promueve la síntesis y acumulación de GAs. Estas GAs se asocian específicamente a su receptor GID1, una enzima que etiqueta otras proteínas promoviendo su degradación. Entre las proteínas que marca para ser degradadas se encuentran las DELLA; de esta manera cuando son degradadas la planta logra estimular sostenidamente las respuestas de elongación celular propias del SAS (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008).

Recientemente se ha establecido que la participación de las proteínas DELLA sobre la vía de los JAs obedece a una interacción directa de las mismas con las proteínas JAZ (Hou et al., 2010). Cuando se produce esta interacción, las proteínas DELLA impiden

que las proteínas JAZs logren interactuar con los FTs a los cuales reprime, por ejemplo con MYC2. También se ha reportado que las proteínas JAZ1, JAZ3 y JAZ9 interactúan directamente con RGA, a través de sus dominios NT y Jas (Cheng et al., 2009). La interacción MYC2-JAZ1 se debilita de manera dependiente de la concentración de RGA, por el contrario, RGA-JAZ1 se debilita de manera dependiente de la concentración de MYC2 (Hou et al., 2010). La interacción entre las proteínas JAZ1 y las DELLA interfiere con la represión de MYC2 mediada por JAZ1, lo que permite la expresión de los genes controlados por MYC2 (Hong et al., 2012). Este *crosstalk* entre la vía de los JAs y las GAs significa que bajo condiciones favorables para el crecimiento, las GA degradan las proteínas DELLA lo cual aumenta la represión de los FTs sensibles a los JAs mediado por las JAZ, resultando de esta manera en una mayor represión de la vía de señalización de los JAs. Por el contrario, bajo condiciones de estrés bióticos, los JAs promueven la degradación de las proteínas JAZ permitiendo que las proteínas DELLA repriman la vía de señalización de las GAs (Figura 4.1) (Kazan and Manners, 2012). Recientemente se demostró que las mutantes *5xdella* (*gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl3-1 rgl2-1*) así como las *gai-1* pierden la represión de la vía de los JA en respuesta a tratamientos con RL (Leone et al., 2014) en plantas de 12 días cultivadas *in vitro*.

El objetivo de los experimentos presentados en este capítulo es determinar si este *crosstalk* hormonal entre las vías de señalización de los JAs y de las GAs participa en la regulación negativa de la respuesta a los JAs producida por bajas relaciones R:RL en plantas adultas cultivadas en sustrato. La hipótesis planteada en este capítulo es que la de-sensibilización de los tejidos a los JAs causada por bajas relaciones R:RL involucra la degradación de las proteínas DELLA. Por lo tanto no se espera encontrar la represión de las respuestas a los JAs producida por tratamientos con RL en las mutantes *4xdella* (*gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1*), *5xdella* y *gai-1*.

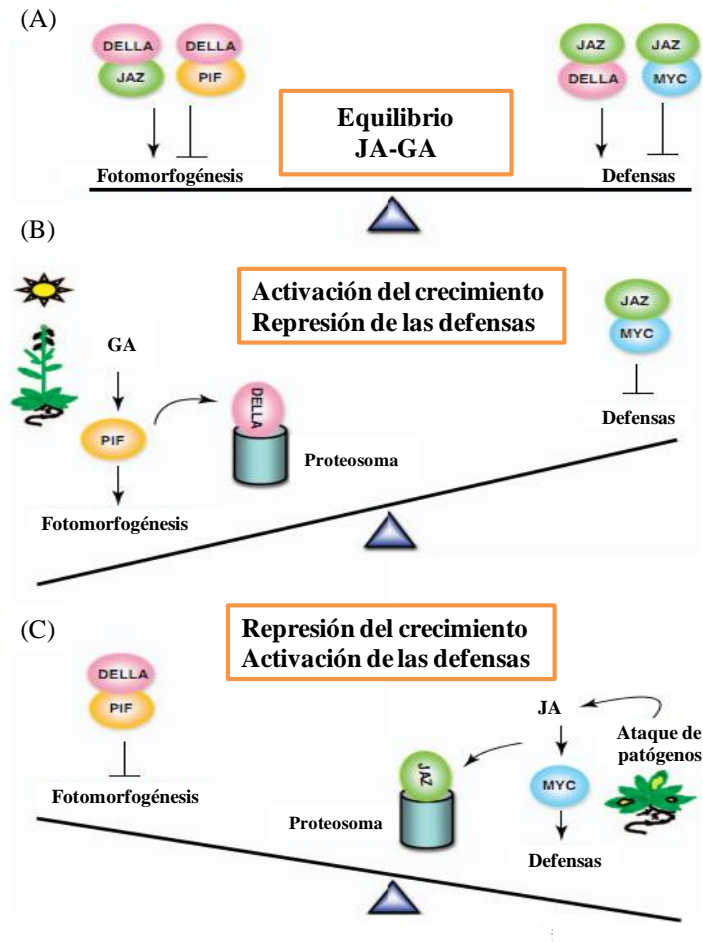


Figura 4-1: Modelo que explica el conflicto entre la defensa y el crecimiento basado en la interacción antagonista entre vías de señalización de las GA y el JA (a) En ausencia de ataque de patógenos, la interacción entre las vías de señalización GA-JA se encuentra en un equilibrio caracterizado por bajos niveles de expresión de genes de defensa y en un crecimiento lento, debido a la competencia de las DELLA y MYC por JAZ, mientras que las JAZs compiten con las PIF por su unión a las DELLA (b) En condiciones de crecimiento adecuadas, el crecimiento se promueve por la degradación de las DELLA mediada por GA mientras que la defensa está reprimida, debido a la interacción JAZ-MYC. Esto inclina la balanza hacia el crecimiento (c) Cuando la planta se ve desafiada por un agente patógeno, se produce la degradación de las proteínas JAZ mediada por JA lo que genera una activación rápida de la vía de señalización del JA, a su vez esto lleva a una mayor supresión del crecimiento a través de la interacción DELLA-PIF, inclinando la balanza hacia la defensa. GA, GIBERELINAS; JAZ, JASMONATE ZIM DOMAIN; MYC, basic helix-loop-helix TF; PIF, PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR. Editado de Kazan and Manners (2012).

4-2 RESULTADOS

4-2-1 Los ecotipos salvajes Ler y Col-0 responden de manera similar en cuanto a la desensibilización de la respuesta a los JAs ocasionada por bajas relaciones R:RL

Para poner a prueba la hipótesis planteada en este capítulo se realizaron distintos ensayos en los cuales las plantas fueron inducidas con solución de MeJA (200 μ M) o con una suspensión de 5×10^5 esporas/ml de *B. cinerea*; el tratamiento con RL comenzó 24 h antes de la inducción de las plantas. A las 72 h de la inducción con MeJA se cosecharon plantas para medir la acumulación de antocianinas y fenólicos solubles. El análisis de las lesiones en las hojas se realizó a las 48-72 h de infectadas (ver materiales y métodos).

Como primer medida se determinó si el ecotipo salvaje Ler respondía de igual manera que el ecotipo Col-0, referido en el capítulo anterior, respecto a la desensibilización de los tejidos a los JAs producida por bajas relaciones R:RL. Para esto se realizaron comparaciones de los dos ecotipos respecto a la acumulación de metabolitos secundarios, antocianinas y compuestos fenólicos solubles y a la sensibilidad a la infección por *B. cinerea*.

Se encontró que la acumulación de antocianinas en ambos ecotipos presentó el mismo patrón (Figura 4.2). La aplicación de MeJA incrementó los niveles de este metabolito y al ser suplementados con RL este incremento fue significativamente menor.

En los bioensayos con *B. cinerea* se encontró que en ambos ecotipos al ser suplementados con RL se produjo un incremento de la susceptibilidad a la infección, las áreas infectadas fueron mayores (Figura 4.3), lo que sugiere que el ecotipo Ler responde de igual modo que Col-0 en respuesta a bajas relaciones R:RL.

4-2-2 El efecto de bajas relaciones R:RL se encuentra conservado en mutantes *della*

Cuando se cuantificaron la acumulación de antocianinas y de compuestos fenólicos solubles en las plantas mutantes se encontró que tanto las mutantes *5xdella* como las *4xdella* presentaron niveles similares de estos metabolitos a los de Ler, tanto en luz ambiente como en el tratamiento con RL (con y sin MeJA) (Figura 4.4 y 4.5). Por lo tanto la acumulación de estos compuestos solubles parece no estar regulado por las proteínas DELLA en este estadio de crecimiento (plantas en estado de roseta de 3-4 semanas cultivadas en suelo).

Posteriormente se realizaron bioensayos con *B. cinerea* en los cuales se encontró que las mutantes *4xdella* eran menos resistentes a la infección. Presentaban lesiones de mayor tamaño que las encontradas en Ler en luz ambiente y cuando se trataron con RL las lesiones fueron aún mayores (Figura 4.6). Estos resultados sugieren que las proteínas DELLA participan de las respuestas mediadas por los JAs, tales como la resistencia contra *B. cinerea*, pero no en la de-sensibilización por bajas relaciones R:RL de la respuesta a los JAs.

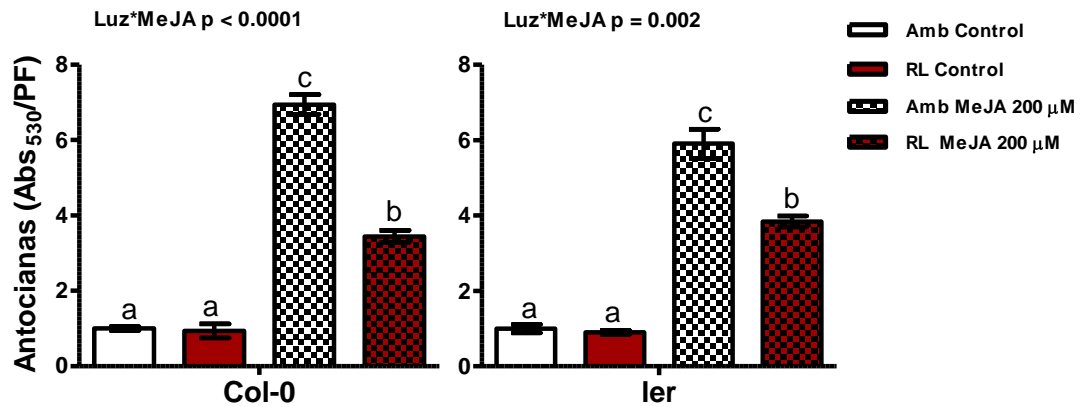


Figura 4.2: Los efectos del RL reduciendo la acumulación de antocianinas. La acumulación fue medida a las 72 h luego de rociar plantas de *A. thaliana* de 3 semanas de edad con una solución de MeJA 200 μM. Los niveles de acumulación están relativizados a los niveles presentados por control en condiciones de luz ambiente. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL; Abs₅₃₀, absorbancia a 530 nm; PF, peso fresco. Las barras de error representan al error estándar (n=5 réplicas). En cada panel, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

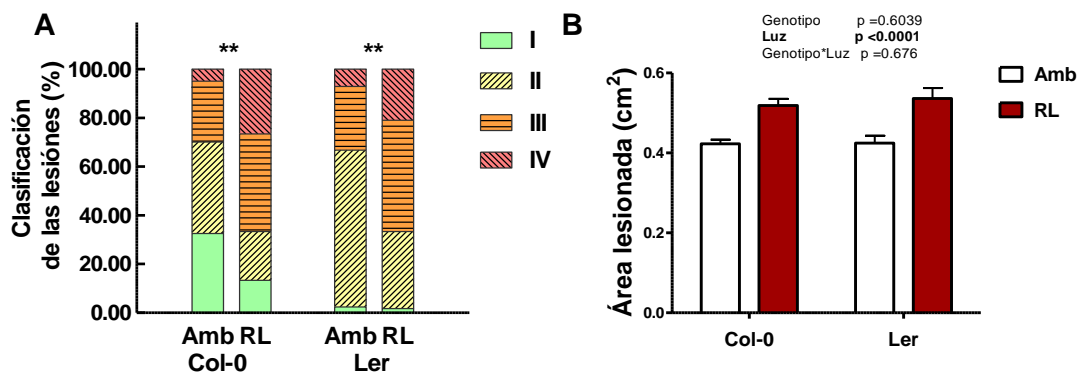


Figura 4.3: Efecto de la inactivación del phyB por radiación RL en la resistencia de plantas de *A. thaliana* a la infección por *B. cinerea*. Los bioensayos se realizaron en plantas de 4 semanas de edad, a las cuales se les inocularon las esporas de *B. cinerea* en sus hojas. Los análisis se realizaron a las 72 h de la inoculación del hongo. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL **A)** Las barras indican la frecuencia de los distintos tipos de lesión (I; II, III; IV) producidas por el hongo (** $P \leq 0.01$) **B)** Se cuantificó el área lesionada de las hojas en cm².

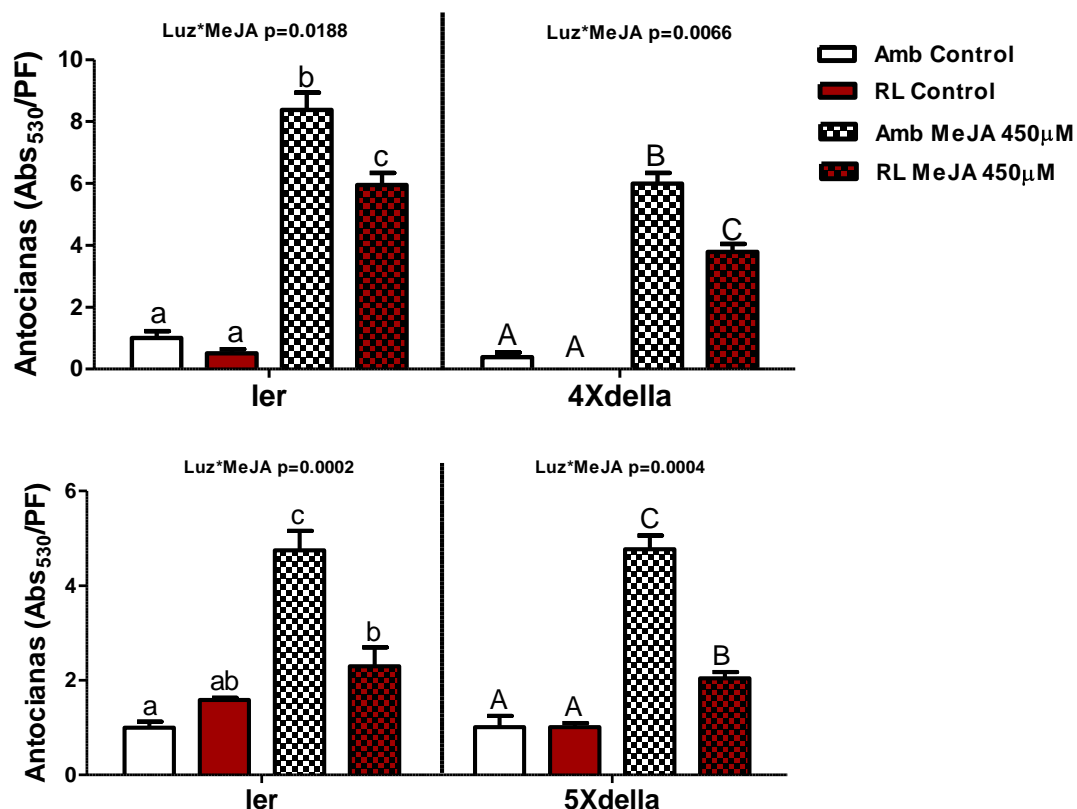


Figura 4.4: El efecto del RL reduciendo la acumulación de antocianinas se encuentra conservado en mutantes *della* (*4xdella* y *5xdella*). La acumulación de estos metabolitos fue medida a las 72 h luego de rociar plantas de *A. thaliana* de 3 semanas de edad con una solución de MeJA 450 μM. Los niveles están relativizados a los del ecotipo salvaje, Ler, control en condiciones de luz ambiente. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL; PF, peso fresco; Abs₅₃₀, absorbancia a 530nm. Las barras de error representan al error estándar (n=5 réplicas). En cada panel, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

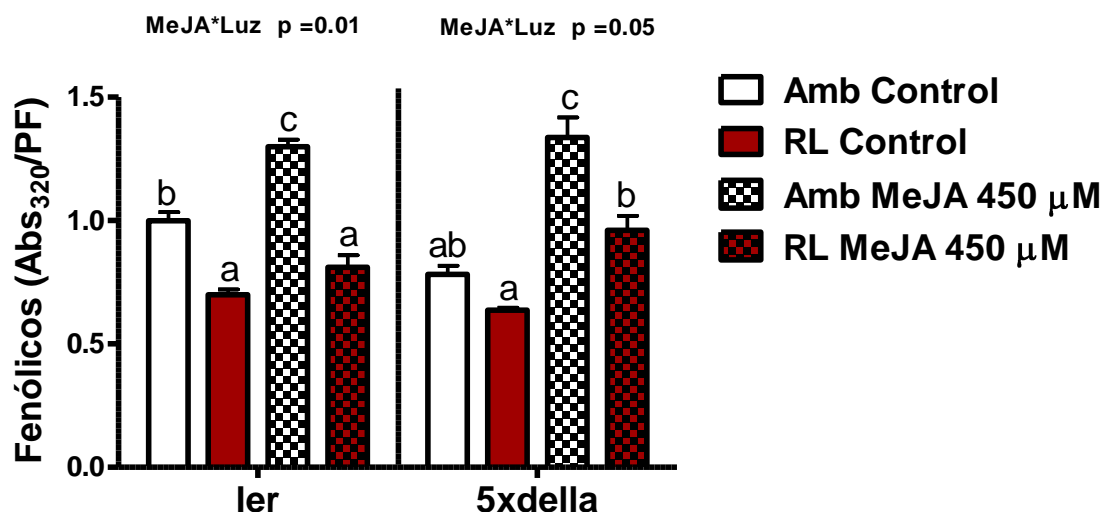


Figura 4.5: El efecto del RL reduciendo la acumulación compuestos fenólicos solubles se encuentra conservado en mutantes *della* (*5xdella*). La acumulación de estos metabolitos fue medida a las 72 h luego de rociar plantas de 3 semanas de edad con una solución de MeJA 450 µM. Los niveles de acumulación están expresados relativos a los del ecotipo salvaje, Ler, control en condiciones de luz ambiente. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL; PF, peso fresco; Abs₃₂₀, absorbancia a 320nm. Las barras de error representan al error estándar (n=5 réplicas). En cada panel, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

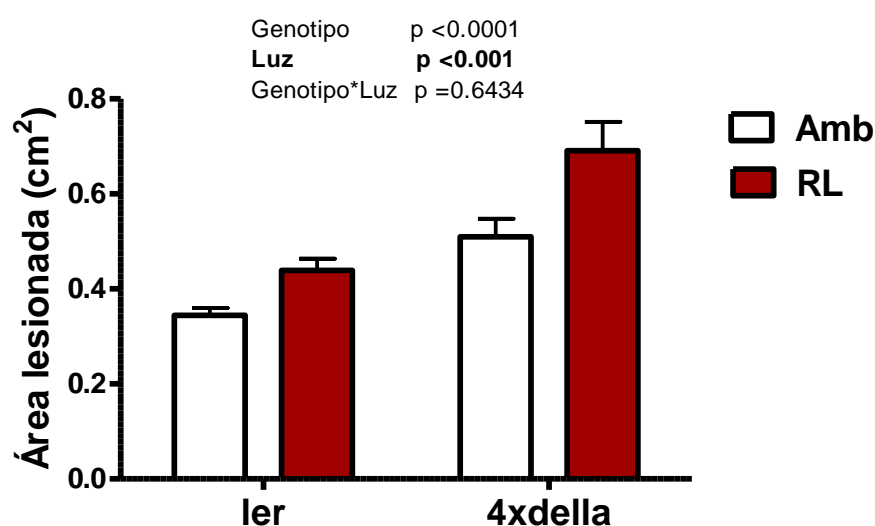


Figura 4.6: Efecto de la inactivación del phyB por radiación RL en la resistencia de mutantes *4xdella* a la infección por *B. cinerea*. Los bioensayos se realizaron en plantas de 4 semanas de edad, a las cuales se les inocularon las esporas de *B. cinerea* en sus hojas. Se cuantificaron las áreas lesionadas de las hojas en cm², a las 72 h de la inoculación del hongo. Los datos fueron transformados con la función log₂ para que cumplan los supuestos del ANOVA (n=7 réplicas). Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL

4-2-3 El efecto de bajas relaciones R:RL se encuentra conservado en plantas mutantes con *della* estables (*gai-1*)

También se utilizó un mutante de ganancia de función, *gai-1*, el cual tiene la particularidad de codificar una versión truncada de la proteína GAI (*gai*) que es estable en presencia de GAs. Cuando se analizó que ocurría respecto a la acumulación de metabolitos secundarios se encontró que estas mutantes presentaron un incremento en la acumulación de antocianinas y compuestos fenólicos solubles en comparación con las Ler. Sin embargo, respondieron de igual modo que las Ler al tratamiento con RL, reprimiendo su acumulación (Figura.4.7). A diferencia de lo que ocurre en las mutantes *4xdella* y *5xdella*, las mutantes *gai-1* parecerían indicar que GAI participa de la respuesta a los JAs en cuanto a la acumulación de metabolitos secundarios de respuesta a JA, tales como las antocianinas y compuestos fenólicos solubles, ya que estas mutantes poseen una mayor acumulación de estos metabolitos. Sin embargo *gai-1* presentó una respuesta normal de de-sensibilización de los tejidos a los JA frente a bajas relaciones R:RL (Figura.4.7).

Cuando se analizó la resistencia al ataque de *B. cinerea* se encontró que las mutantes *gai-1* eran más resistentes a la infección que en los controles, pero bajo tratamiento con RL su sensibilidad a la infección se veía incrementada (Figura 4.8).

Estos resultados, en su conjunto sugieren que las proteínas DELLA estarían interviniendo en la vía de señalización de los JAs pero su degradación no permite explicar la represión de la respuesta a los JAs causada por bajas relaciones R:RL en plantas adultas.

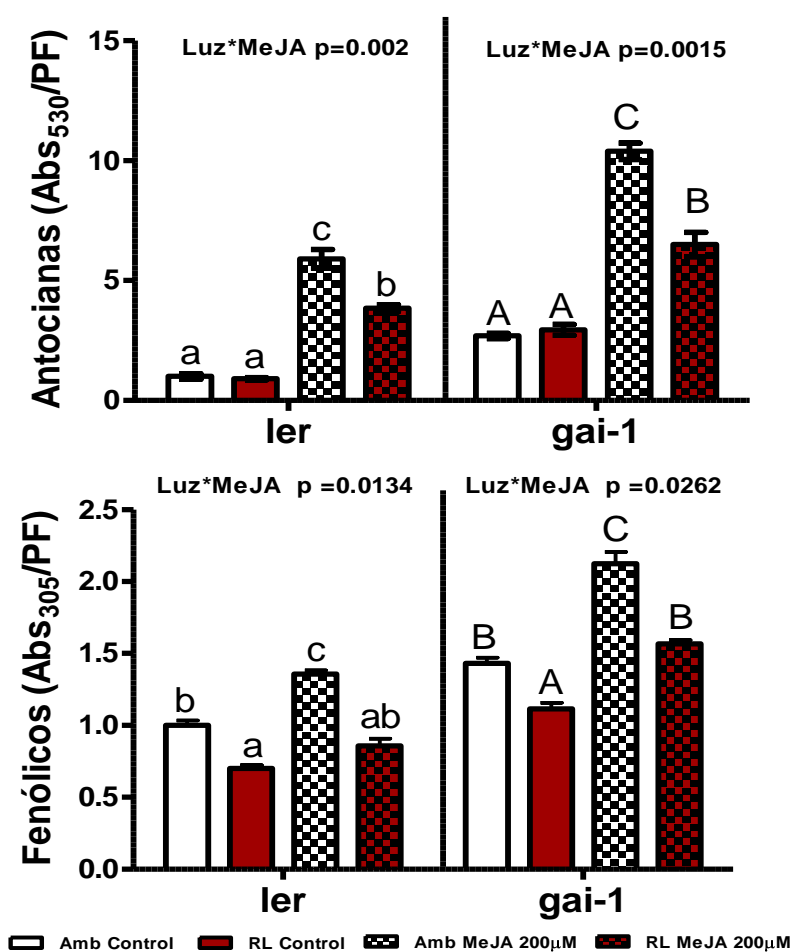


Figura 4.7: Los efectos del RL reduciendo la acumulación compuestos fenólicos solubles y antocianinas se encuentran conservadas en mutantes *della* (*gai-1*). La acumulación de estos metabolitos fue medida a las 72 h luego de rociar plantas de *A. thaliana* de 3 semanas de edad con una solución de MeJA 200 µM. Los niveles de acumulación están relativizados a los del ecotipo salvaje, Ler, control en condiciones de luz ambiente. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL; PF, peso fresco; Abs₅₃₀, absorbancia a 530nm Abs₃₂₀, absorbancia a 320nm. Las barras de error representan al error estándar (n=5 réplicas). En cada panel, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

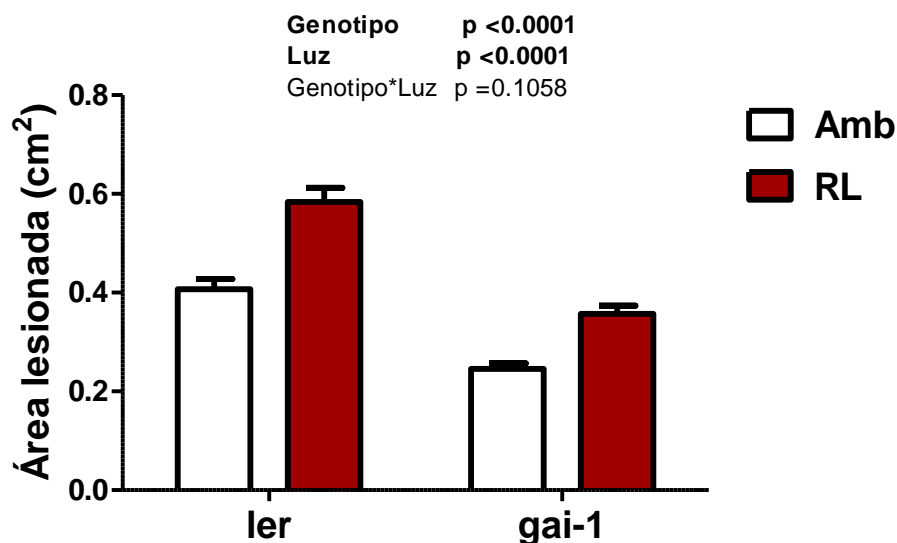


Figura 4.8: Efecto de la inactivación del phyB por radiación RL en la resistencia de mutantes *gai-1* a la infección por *B. cinerea*. Los bioensayos se realizaron en plantas de 4 semanas de edad a las cuales se les inocularon las esporas de *B. cinerea* en sus hojas. Se cuantificaron las áreas lesionadas de las hojas en cm² a las 72 h de la inoculación del hongo (n=8 réplicas). Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL

4-3 DISCUSIÓN

En este capítulo se demuestra que las proteínas DELLA participan en la vía de señalización de los JAs. Los resultados demuestran que tanto las mutantes *5xdella* como las *4xdella* poseen la respuesta a los JAs normal con respecto a la acumulación de antocianinas (Figura 4.4) como de compuestos fenólicos (Figura 4.5) pero poseen menor resistencia al ataque del patógeno necrótrofo *B. cinerea* (Figura 4.6). En el caso de la mutante *gai-1* se encontró que presentaban mayor acumulación de antocianinas y de compuestos fenólicos (Figura 4.7) respecto a los encontrados en los controles, como así también, una mayor resistencia a la infección de *B. cinerea* (Figura 4.8). Estos resultados concuerdan con trabajos publicados recientemente que demuestran que las mutaciones en las proteínas DELLA regulan positivamente las respuestas al JA (Navarro et al., 2008; Leone et al., 2014).

Se ha propuesto un mecanismo por el cual las proteínas DELLA podrían estar regulando la vía de señalización de los JAs (Hou et al., 2010; Leone et al., 2014). Se propone que la regulación de la vía de los JAs por acción de las proteínas DELLA se debe a una interacción de éstas con las proteínas JAZ (JAZ-DELLA). Esta interacción interfiere con la actividad de las proteínas JAZ reprimiendo sus FTs blanco (Hou et al., 2010; Yang et al., 2012). En situaciones de competencia, las proteínas DELLA son

rápidamente degradadas (Leone et al., 2014) y se liberan las proteínas JAZ para así lograr reprimir los FTs blanco. Además, se propone a este mecanismo como uno de los utilizados por las plantas para reprimir las defensas dependientes del JA en situaciones de competencia lumínica (Leone et al., 2014).

A diferencia de lo reportado en el trabajo de Leone et al. (2014), los experimentos descritos en este capítulo sugieren que las mutantes de DELLA responden al tratamiento con RL reprimiendo la vía de los JAs de la misma manera que las plantas del ecotipo salvaje (Figuras 4.4; 4.5; 4.6; 4.7 y 4.8). Esto puede deberse a diferencias en los sistemas utilizados para evaluar el efecto del tratamiento con RL sobre la expresión del sistema de defensa. En esta tesis se utilizaron plantas de 3-4 semanas, mientras que en el trabajo citado anteriormente utilizaron plántulas de 12 días; otra diferencia es que en los experimentos aquí presentados se utilizaron plantas cultivadas en un sustrato sólido (perlita: vermiculita: turba, 1:1:1) mientras que en el trabajo de Leone et al. (2014) se utilizó un sistema de cultivo *in vitro*.

Se han realizado análisis ontogénicos que demuestran que las proteínas DELLA regulan distintos FTs dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentran las plantas. Éstos señalan que menos del 3,6% de los genes blanco de las proteínas DELLA son compartidos entre un estado de crecimiento vegetativo y uno de floración (Cao et al., 2006; Zentella et al., 2007; Hou et al., 2008).

Las diferencias encontradas con el trabajo de Leone et al. (2014) sugieren que la ontogenia o las condiciones de estrés podrían estar modificando la importancia de las proteínas DELLA en la regulación de la vía de señalización de los JAs. Podría plantearse que en los primeros estadios de crecimiento la degradación de las proteínas DELLA resulta en represión de la vía de los JAs ante bajas relaciones R:RL, mientras que en estadios más tardíos, previos a la floración, estas proteínas ya no juegan un papel regulatorio tan importante.

4-4 CONCLUSIONES

Los resultados aportados en este capítulo indican que las proteínas DELLA intervienen en las respuestas defensivas desencadenadas por los JAs. Pero su degradación no parece ser necesaria para la regulación negativa de la respuesta a los JAs producida por la simulación de competencia lumínica en plantas adultas de 3-4 semanas cultivadas en sustrato.

CAPÍTULO 5

**La estructura de la cromatina participa
en la represión de la respuesta a JA por
bajas relaciones R:RL**

CAPÍTULO 5

La estructura de la cromatina participa en la represión de la respuesta a JA por bajas relaciones R:RL

5-1 INTRODUCCIÓN

En las células eucariotas la actividad génica no sólo es controlada por la secuencia nucleotídica del ADN, sino que también es controlada por la accesibilidad al genoma de las proteínas reguladoras (tales como FTs) la cual depende de la arquitectura de la cromatina (Berr et al., 2012).

La cromatina es el conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas que se encuentran en el núcleo. El empaquetado del ADN, cargado negativamente, a través de la asociación con histonas, cargadas positivamente, forma el nucleosoma que es la unidad estructural de la cromatina (Kornberg, 1974; Kornberg and Thomas, 1974; Khorasanizadeh, 2004). La configuración de la cromatina puede ser alterada para permitir o impedir el acceso de la maquinaria de transcripción, por modificaciones covalentes de las histonas en los extremos N-terminales expuestos en el nucleosoma. Básicamente, los genes situados en regiones de heterocromatina (cromatina condensada) se encuentran con frecuencia silenciados (no expresados), mientras que los genes situados en regiones de eucromatina (cromatina laxa) son transcritos. La estructura de la cromatina se encuentra regulada por diferentes modificaciones post-traduccionales reversibles de las histonas, como por ejemplo la acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación, glicosilación, etc. (Kouzarides, 2007). Típicamente, la acetilación de histonas por las acetiltransferasas de histonas (HAT) se asocia con la activación transcripcional, mientras que la deacetilación, por las HDAs, se vincula con la represión de la transcripción (Payankaulam et al., 2010). La metilación de histonas y / o ubiquitinación pueden activar o reprimir la transcripción dependiendo ello del lugar donde ocurre (Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2009; Roudier et al., 2011).

Aunque la evidencia genética, bioquímica y molecular ha demostrado que las proteínas JAZ son represores transcripcionales todavía sigue siendo desconocido cómo es que funciona esta represión a nivel molecular. La ausencia de un motivo aminoacídico asociado a represión conocido en la mayoría de las proteínas JAZ sugiere que estas proteínas reprimen la transcripción a través del reclutamiento de co-represores. En tal sentido, estudios recientes han demostrado que las proteínas JAZ reclutan a miembros de la familia de co-represores Groucho (Gro) / Tup1 (Pauwels et

al., 2010; Consortium, 2011; Fernández-Calvo et al., 2011), los cuales se encuentran conservados evolutivamente, actuando a través de la formación de complejos con enzimas modificadoras de histona como las HDAs. La deacetilación de histonas afecta numerosos procesos tales como el crecimiento y desarrollo, el tiempo de floración, la tolerancia al frío, la embriogénesis, el desarrollo de pelos radiculares y las respuestas a salinidad, entre otros (He et al., 2003; Xu et al., 2005; Tanaka et al., 2008; Zhu et al., 2008; Chen et al., 2010).

Estudios previos indican que existe una interacción entre la deacetilasa de histona RPD3 tipo 6 (HDA6) y la proteína COI1 (Devoto et al., 2002), lo que evidencia que existe un vínculo entre el control epigenético y la vía de señalización de los JAs. Otros estudios indican que los niveles de transcripción de algunos genes de respuesta a los JAs se encuentran alterados en mutantes con pérdida de función HDA6 o HDA19 y en plantas transgénicas que sobreexpresan estas HDAs (Zhou et al., 2005; Wu et al., 2008). También existe evidencia que tanto el phyB como la HDA6 regulan positivamente la organización global de la cromatina de manera dependiente de la luz (Tessadori et al., 2009) y recientemente se ha reportado que la represión de JAZ1 sobre factores de transcripción como EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3) y EIL1 (EIN3-LIKE 1), reguladores positivos de las vías de señalización de los JAs y del ET, requiere del reclutamiento de HDA6 como co-represor (Figura 5.1) (Zhu et al., 2011). Sin embargo, la acción de las HDAs en la vía de señalización de los JAs aún no es clara.

El objetivo de este capítulo es determinar el rol de las HDAs, en particular de HDA6, en la regulación negativa de las respuestas a los JAs producida por bajas relaciones R:RL. La hipótesis planteada es que la desensibilización de los tejidos a los JAs por bajas relaciones R:RL es mediada por cambios en el estado de compactación de la cromatina, producidos por la HDA6. Por lo tanto esperamos no encontrar una represión de la vía de señalización de los JAs en respuesta a tratamientos con RL tanto en las mutantes de *hda6* como cuando se inhiba farmacológicamente a las HDAs.

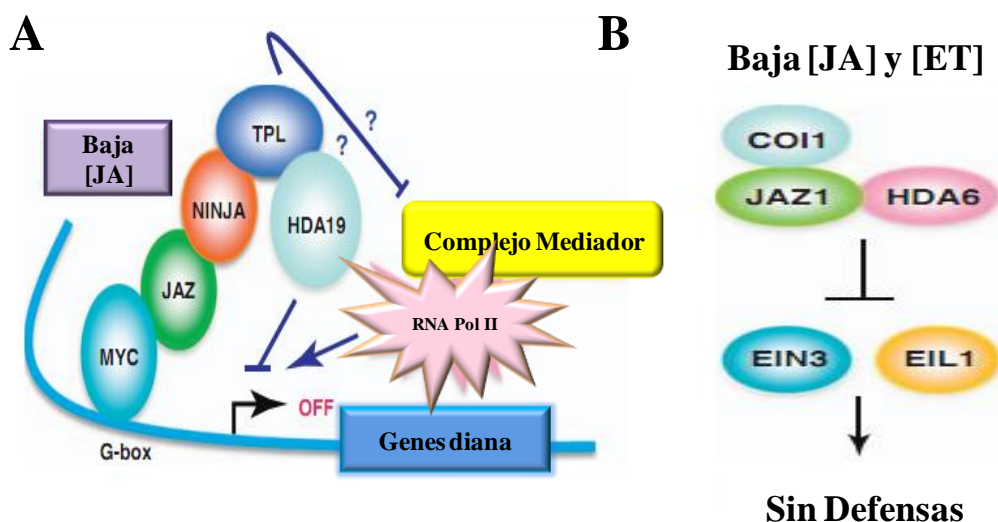


Figura 5.1: Posibles mecanismos que subyacen a la represión transcripcional mediada por las proteínas JAZ A) A bajas concentraciones de JA, el complejo JAZ-NINJA-TPL reprime la actividad transcripcional de MYC2 mediante el reclutamiento de deacetilasas de histonas (HDAs), como HDA19, inhibiendo la actividad de la ARN polimerasa II-complejo mediador. Esto resulta en la remodelación de la cromatina en un estado silencioso y la supresión de la expresión génica de respuesta al JA. "?" hace referencia a las asociaciones propuestas (ej. TPL-HDA19 interacción y el efecto negativo de TPL sobre el complejo mediador) que se deducen de estudios en otros eucariotas, pero aún no se han demostrado experimentalmente en *Arabidopsis*. A altos niveles de JA, los represores JAZ se degradan rápidamente en una manera dependiente de COI1 y se activa la expresión de los genes de respuesta al JA (no se muestra en la figura) B)-Nuevas funciones de las proteínas JAZ en el *crossstalk* JA-ET. A bajas concentraciones de JA, las proteínas JAZ reclutan al co-represor hda6 y reprimen a EIN3 y EIL1 para mantener bajo control las respuestas de defensa. Las flechas y flechas truncadas representan las regulaciones positivas y negativas, respectivamente. HDA19, DESACETILASA de HISTONA19; HDA6, DESACETILASA de HISTONA 6; JAZ, JASMONATE ZIM DOMAIN; MYC, factor de transcripción *basic-helix-loop-helix*; NINJA, *NOVEL INTERACTOR of JAZ*; TPL, *TOPELESS*; EIL1, *EIN3-LIKE 1*; EIN3, *ETHYLENE INSENSITIVE 3*. Editado de Kazan and Manners (2012).

5-2 RESULTADOS

5-2-1 Las HDAs participan en la regulación negativa de la expresión de genes de la vía de los JA producida por bajas relaciones R:RL.

Para poner a prueba la hipótesis de que las HDA6 participan en la desensibilización de los tejidos a los JAs por señales de competencia lumínica con plantas vecinas, se realizaron experimentos *in-vitro* en los cuales se utilizó un inhibidor específico de HDAs, Trichostatin A (TSA), para imitar la pérdida de su actividad.

En estos experimentos se pudo observar que la aplicación de TSA produce un incremento en la expresión génica del FT *ERF1*. Pero a diferencia de los controles el tratamiento con RL no produjo una represión en la expresión de este gen (Figura 5.2).

Cuando se analizó qué pasaba con la expresión del gen *PDF1.2* se encontró que este presentaba un patrón similar al del gen *ERF1*, es decir la aplicación de TSA determinó que no se reprima la expresión de este gen en tratamiento con RL y MeJA (Figura 5.3).

Estos resultados de expresión génica de marcadores de la vía de los JAs sugieren que las HDAs y, por lo tanto, la estructura de la cromatina juegan un papel en la vía de señalización de los JAs y, en particular, en la de-sensibilización de los tejidos a los JAs producida por bajas relaciones R:RL en *A. thaliana*.

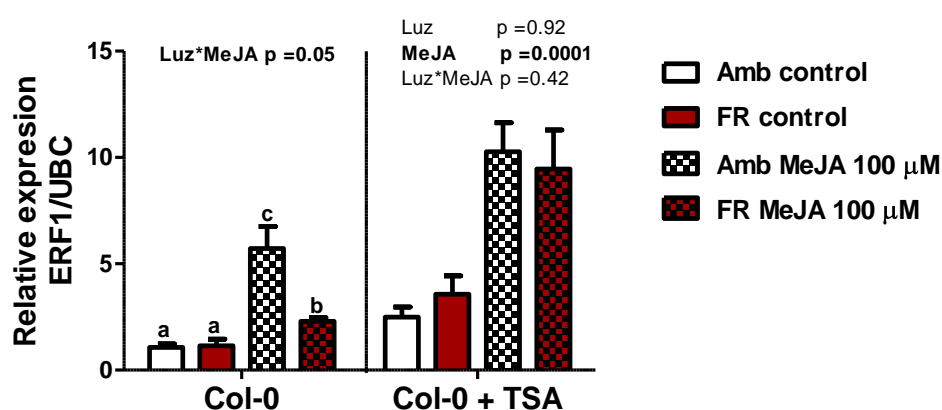


Figura 5.2: La inhibición de las HDAs con Trichostatin A (TSA) aumenta la expresión del gen *ERF1* y reprime la regulación negativa de la expresión de este gen en respuesta a bajas relaciones R:RL. La expresión de *ERF1* fue cuantificada a las 5 h de inocular plantas de *A. thaliana* ecotipo salvaje (Col-0) de 10 días de edad, cultivadas in vitro, con una solución de MeJA de concentración 100 µM y de TSA 5 µg/ml. Los niveles de expresión fueron relativizados a Col-0 control en luz ambiente y a la expresión del gen de expresión constitutiva *UBC* (*UBIQUITINA*). Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL. Los datos fueron transformados con la función \log_2 para que cumplan los supuestos del ANOVA. Las barras de error representa al error estándar (n=5 réplicas). En cada panel, las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

5-2-2 Las mutaciones de HDA6 hacen a *A. thaliana* más resistente al ataque de *B. cinerea* e insensible a bajas relaciones R:RL

La siguiente aproximación para probar la hipótesis planteada se realizó utilizando plantas de *A. thaliana* mutantes de HDA6, *axe1-4* y *axe1-5*. Con estas mutantes se realizaron bioensayos en los cuales plantas de entre 3-4 semanas de edad fueron inoculadas con esporas del hongo *B. cinerea* y luego de 48-72 h se analizaron las lesiones.

Se encontró que en ambas mutantes las lesiones producidas por el hongo necrótrofo no se vieron incrementadas por el tratamiento RL como ocurrió en las Col-0 (Figura 5-3). También se encontró que las mutantes *axe1-4* que las lesiones eran menores a las encontradas en los controles (Col-0).

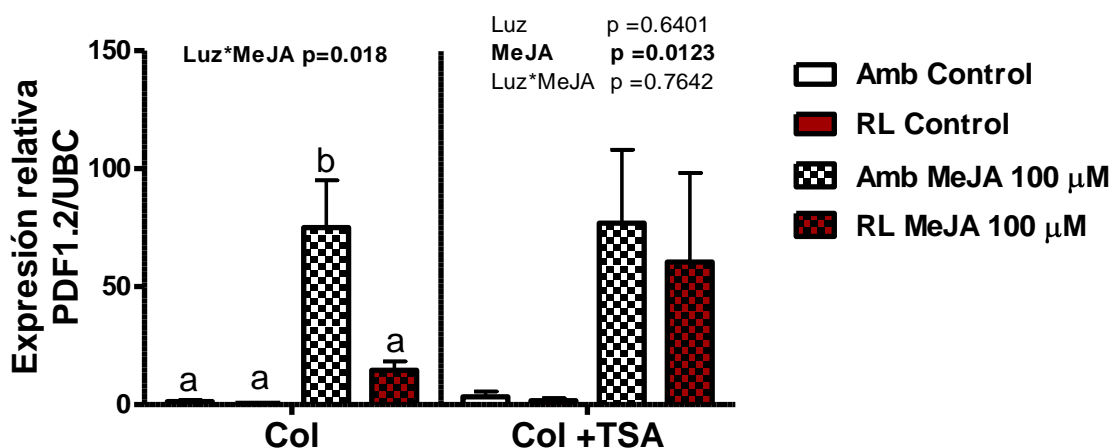


Figura 5.3: La inhibición de las HDAs con Trichostatin A (TSA) aumenta la expresión del gen *PDF1.2* y reprime la regulación negativa de la expresión de este gen en respuesta a bajas relaciones R:RL. La expresión de *PDF1.2* fue cuantificada a las 5 h de inocular plantas de *A. thaliana* ecotipo salvaje (Col-0) de 10 días de edad, cultivadas in vitro, con una solución de MeJA 100 μ M y de TSA 5 μ g/ml. Los niveles de expresión fueron relativizados a Col-0 control en luz ambiente. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL y a la expresión del gen de expresión constitutiva *UBC* (*UBIQUITINA*). Las barras de error representan al error estándar (n=5 réplicas). Los datos tuvieron que ser transformados con la función raíz cuadrada para que cumplan los supuestos del ANOVA. En cada panel, las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

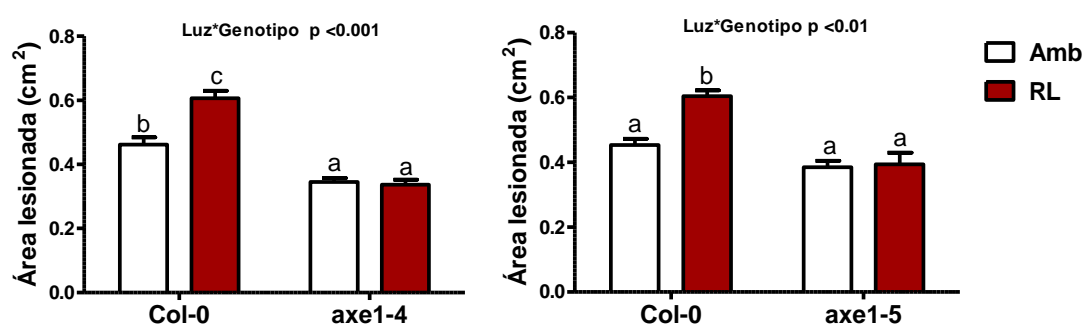


Figura 5.4: La sensibilización a la infección de *B. cinerea* producida por bajas relaciones R:RL requiere de HDA6 funcional. Hojas de *A. thaliana* ecotipo salvaje (Col-0), *axe1-4* y *axe1-5* de 3 semanas de edad fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea*. Los análisis se realizaron a las 72 h de la inoculación del hongo. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL. Las barras de error representan al error estándar (n=8 réplicas). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos y ó genotipos.

5-2-3 La mutaciones de HDA6 impiden la represión por las bajas relaciones R:RL de la acumulación de metabolitos secundarios dependientes de los JAs

Cuando se analizó la acumulación de metabolitos secundarios activados por la vía de señalización de los JAs se encontró que ambas mutantes, *axe1-4* y *axe1-5*, pierden la capacidad del RL para reprimir la acumulación de antocianas (Figura 5.5).

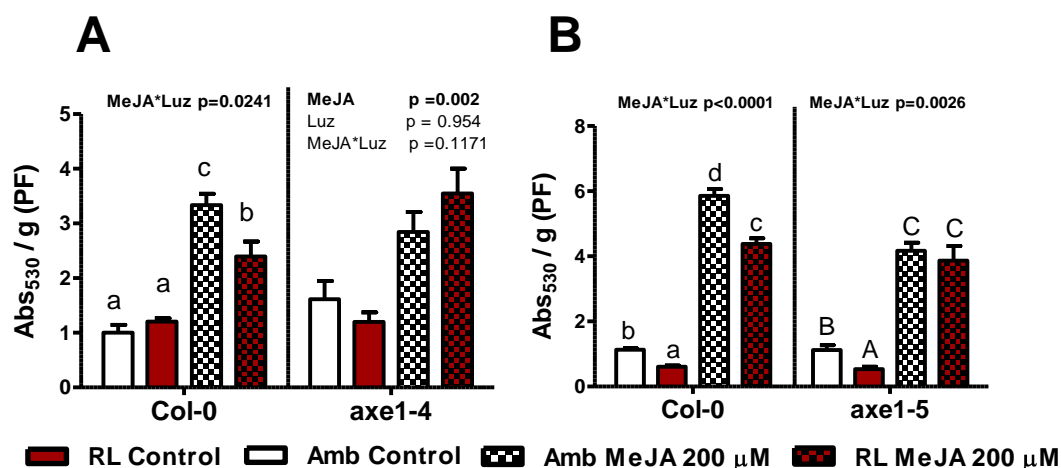


Figura 5.5: La HDA6 es necesaria para que las bajas relaciones R:RL reduzcan la acumulación antocianas en hojas producida por la percepción de MeJA. La acumulación de este metabolito fue medida a las 72 h luego de rociar plantas de *A. thaliana* de 3 semanas de edad, cultivadas en tierra, con una solución de MeJA 200 μM. Los niveles de acumulación están relativizados a los del ecotipo salvaje, Col-0, control en condiciones de luz ambiente. Amb, luz ambiente; RL, bajas relaciones R:RL. Las barras de error representan al error estándar (n=6 réplicas). En B los datos fueron transformados con la función \log_2 para que cumplan los supuestos del ANOVA. En cada panel, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos **A)** efectos de MeJA y RL sobre la acumulación de antocianas, en la mutante *axe1-4* **B)** efectos de MeJA y RL sobre la acumulación de antocianas, en la mutante *axe1-5*.

5-3 DISCUSIÓN

Un componente esencial en las respuestas de estrés de las plantas reside en su capacidad de reprogramar su expresión génica. Entre los mecanismos que llevan a las plantas para realizar esta reprogramación se encuentran las modificaciones en la compactación de la cromatina. Las modificaciones post-traduccionales de las histonas generan cambios en los niveles de compactación de la cromatina que facilitan o impiden el ingreso de la maquinaria transcripcional del ADN.

En este capítulo se demostró que la inhibición de las HDAs produce un aumento en la expresión de los genes marcadores de la vía de los JAs, *ERF1* y *PDF1.2* (Figuras 5.2

y 5.3) en concordancia con estudios realizados recientemente (Zhou et al., 2005; Zhu et al., 2011), y se demostró una disminución en la capacidad infecciosa de *B. cinerea* en mutantes de HDA6 (Figura 5.4). Se ha propuesto que el complejo SCF^{COII}-JAZ se asocia con HDA6 para reprimir la respuesta a los JAs (Berr et al., 2012). En ausencia de JA-Ile las proteínas JAZ podrían reclutar a las HDA6 y de esta manera reprimir la respuesta de los JAs. En cambio, en presencia de JA-Ile las proteínas JAZ y HDA6 serían reclutadas por el complejo SCF^{COII} para su degradación y por lo tanto no ocurriría la represión de la respuesta a los JAs mediada por HDA6. Aquí se presenta evidencia de que este podría ser uno de los mecanismos utilizados por las plantas para inhibir la respuesta a los JAs provocadas por señales de competencia lumínica. En presencia de competencia lumínica la proteína JAZ10 se degrada a una velocidad menor (Leone et al., 2014) y, por lo tanto, el complejo JAZ10-HDA6 estaría más tiempo inhibiendo la vía. En este capítulo se demostró que por la inhibición de las HDAs se pierde el efecto del RL en cuanto a la represión de genes marcadores de la vías de los JAs (Figuras 5.2 y 5.3). En mutantes de *hda6* tanto la resistencia a *B. cinerea* (Figura 5.4) como la acumulación de metabolitos secundarios característicos de la vía de los JA no se ven afectadas por el tratamiento con RL (Figura 5.5).

5-4 CONCLUSIONES

En este capítulo se demostró que cambios en el estado de acetilación participan en la represión de la respuesta de los JAs por bajas relaciones R:RL. A nivel de la expresión génica cuando se inhiben las HDAs las plantas no responden al tratamiento con RL. Por su parte, las mutantes de HDA6 tampoco respondieron al tratamiento con RL en los bioensayos ni en la acumulación de metabolitos secundarios.

CAPÍTULO 6

Conclusión general

CAPÍTULO 6

Conclusión general

Las plantas que crecen en altas densidades tienden a ser sombreadas por sus vecinas lo cual genera un ambiente que las hace más vulnerables al ataque de insectos y patógenos. Como ya se mencionó previamente, este efecto presenta interés desde el punto de vista agronómico por disminuir las defensas de los cultivos sembrados a alta densidad. A pesar de la importancia del conocimiento de los mecanismos asociados a las respuestas de defensa de las plantas en presencia de vecinos, aún existe poca información al respecto.

Estudios en nuestro laboratorio, incluidos aquellos presentados en esta tesis, muestran que la regulación negativa de las defensas de las plantas que se encuentran en competencia lumínica con sus vecinas o bajo un riesgo inminente de competencia se correlaciona con una disminución en la sensibilidad de los tejidos a los JAs (Moreno et al., 2009; Cerrudo et al., 2012; de Wit et al., 2013; Leone et al., 2014). A partir de estas observaciones, se han propuesto múltiples hormonas y mecanismos que podrían mediar la regulación de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL (Figura 1.8). Entre las hormonas se ha puesto énfasis en el SA y las GAs, y entre los mecanismos se ha postulado que las proteínas JAZ10 y sus variantes de *splicing*, así como proteínas modificadoras de histonas podrían ser determinantes del efecto represor del RL sobre la vía de los JAs.

El objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue poner a prueba algunas de estas hipótesis utilizando los recursos disponibles en la planta de referencia *Arabidopsis thaliana*.

En esta tesis se demuestra que la simulación de plantas vecinas mediante la irradiación con RL en forma lateral reprime la expresión de genes marcadores de la vía de los JAs y la acumulación de metabolitos secundarios dependientes de esta vía de señalización. También se demuestra que estos cambios a nivel transcripcional y de metabolitos secundarios, disparados por bajas relaciones R:RL, correlacionan con un aumento en la sensibilidad de plantas de *A. thaliana* a la infección del hongo necrótrofo *B. cinerea*. Por otro lado, la tesis aporta evidencias a las ya existentes confirmando que la inactivación de phyB es responsable de mediar la represión de la vía de los JAs frente a bajas relaciones R:RL.

Como primer hipótesis de esta tesis se planteó que la de-sensibilización de los tejidos a los JAs involucra la activación de elementos de la vía del SA. La acción antagónica de estas dos hormonas ha sido ampliamente estudiada (Kunkel and Brooks, 2002; Bostock, 2005; Brooks et al., 2005; Uppalapati et al., 2007; Pieterse et al., 2009; Thaler et al., 2012) y se encuentran descritos los mecanismos utilizados por la vía del SA para modular la respuesta de la vía de señalización de los JAs (Koornneef and Pieterse, 2008; Leon-Reyes et al., 2009; Pieterse et al., 2009; Verhage et al., 2010). Se realizaron experimentos para probar si la represión de la vía de señalización de los JAs por bajas relaciones R:RL utiliza elementos de la vía de SA. En éstos se demostró que no es necesario que las plantas sean capaces de sintetizar SA o activar respuestas frente a SA para que ocurra esta represión de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL. También se demostró que la represión de la vía de los JAs en plantas de *A. thaliana* por bajas relaciones R:RL ocurre a nivel del módulo SCF^{COII}-JAZ de percepción de JA-Ile. A diferencia de esto, el efecto antagónico del SA sobre la vía de los JAs ocurre río abajo de este módulo de percepción. Sobre esta base se rechazó la hipótesis de que elementos de la vía del SA intervienen en la represión de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL, lo cual representa un avance importante que permite enfocar los esfuerzos en hipótesis alternativas sobre la naturaleza del mecanismo de represión.

La segunda hipótesis a poner a prueba fue que la de-sensibilización de los tejidos a los JAs está mediada por las proteínas JAZ10 y sus variantes de *splicing*, reguladores negativos de la respuesta a los JAs. Observaciones previas indicaban que la transcripción del gen *JAZ10* puede aumentar en respuesta a tratamientos con RL (Moreno et al., 2009) y estudios recientes demuestran que el RL suplementario estabiliza a la proteína JAZ10 frente a tratamientos de JA (Leone et al., 2014). Además se ha reportado que el gen *JAZ10* sufre *splicing* alternativo, generando 3 proteínas con distintos grados de sensibilidad al JA (Chung and Howe, 2009). Los bioensayos realizados con *B. cinerea* demuestran que *JAZ10* es necesario para el efecto del RL aumentando la sensibilidad de *A. thaliana* a este patógeno y, sugieren que la variante de *splicing* JAZ10.4 podría jugar un rol determinante de este efecto.

La tercer hipótesis fue que la de-sensibilización de los tejidos a los JAs involucra la acción de proteínas DELLA. Se ha demostrado que las proteínas DELLA regulan positivamente las respuestas a los JAs (Navarro et al., 2008; Leone et al., 2014). La vía

de señalización de las GAs, a través de las proteínas DELLA, participa en los mecanismos de defensa frente al estrés biótico mediante una interacción con la vía de señalización de los JAs (Hou et al., 2008; Navarro et al., 2008; Cheng et al., 2009; Wild et al., 2012; Yang et al., 2012). Se ha establecido que este *crosstalk* entre las dos vías se debe a una interacción antagónica entre las proteínas JAZ y las proteínas DELLA (Hou et al., 2010) (Figura 4.1). Por lo tanto, bajo condiciones favorables para el crecimiento, las GAs participan en la degradación de las proteínas DELLA, lo que libera proteínas JAZ para ejercer su acción represora sobre los FTs involucrados en la activación de defensas dependientes del JA. Por el contrario, bajo condiciones de estrés biótico, los JAs promueven la degradación de las proteínas JAZ permitiendo que las proteínas DELLA repriman FTs relacionados con el crecimiento (p. ej. PIFs) (Yang et al., 2012). Evidencias obtenidas en plántulas jóvenes de *A. thaliana* cultivadas in vitro muestran que la activación de la vía de señalización de las GAs frente a bajas relaciones R:RL juega un papel reprimiendo las respuestas a los JAs (Leone et al., 2014). Los resultados presentados en esta tesis sugieren que, en rosetas de *A. thaliana* cultivadas en suelo, la vía de señalización de las GAs no juega un rol importante en la represión de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL. Resta por entender las bases de estas diferencias y determina si las mismas se deben a razones ontogénicas o fisiológicas.

La última hipótesis planteada fue que la de-sensibilización de los tejidos frente a los JAs está mediada por cambios en la estructura de la cromatina, llevados a cabo por la HDA6. La actividad génica está regulada por cambios en los niveles de compactación de la cromatina. Cuando la cromatina se encuentra laxa el acceso de la maquinaria transcripcional y/o FT está permitido, mientras que este se encuentra impedido cuando la cromatina se encuentra compactada (Berr et al., 2012). La estructura de la cromatina se encuentra regulada por diferentes modificaciones post-traduccionales reversibles de las histonas, como por ejemplo la acetilación (Kouzarides, 2007). Esta última, generalmente se encuentra asociada con la activación transcripcional, mientras que la deacetilación, por las HDAs, se vincula con la represión de la transcripción (Payankaulam et al., 2010). Estudios previos han reportado que la HDA6 interactúa con COI1, miembro del módulo SCF^{COI1} de percepción de JA-Ile (Devoto et al., 2002). También ha sido documentado que la proteína JAZ1 requiere del reclutamiento de HDA6 como co-represor para reprimir la vía del ET y del JA (Zhu et al., 2011). Los resultados aportados por esta tesis sugieren que, en plantas de *A. thaliana*, el efecto de

las bajas relaciones R:RL reprimiendo la vía de los JAs se encuentra mediado en parte por modificaciones post-traduccionales de las histonas, en particular las llevadas a cabo por las HDA6.

En base a todas las evidencias, y a modo de conclusión final, esta tesis presenta un modelo de los mecanismos que podrían ser utilizados por las plantas para reprimir la respuesta a los JAs bajo condiciones de competencia (Figura 6.1). En este modelo se propone que bajo condiciones normales la respuesta a los JAs se encuentra inactivada por las proteínas JAZ10 que reclutan a las proteínas HDA6, las cuales mantienen a la cromatina compactada impidiendo la expresión de los genes de respuesta de la vía de señalización de los JAs. Bajo condiciones de estrés por patógenos o insectos herbívoros aumenta la concentración de JA-Ile que al unirse con su receptor, el complejo proteico SCF^{COI1}, provoca la ubiquitinación de las proteínas JAZ10 y las HDA6 quienes posteriormente serán degradadas por el proteosoma 26S y por lo tanto se activa la vía. En condiciones de competencia lumínica y estrés por patógenos o insectos herbívoros si bien la concentración de JA-Ile aumenta, con la consecuente degradación de las proteínas JAZ10, pero estas presentan mayor estabilidad bajo condiciones de bajas relaciones R:RL (Chico et al., 2014; Leone et al., 2014) (posiblemente debido a un aumento en las proporciones de las variantes de *splicing* insensibles al JA, como JAZ10.4, aunque esta explicación requiere de evidencias adicionales) y como consecuencia, resulta en una atenuación de las respuestas activadas por el JA y un aumento en la sensibilidad a patógenos necrótrofos e insectos herbívoros.

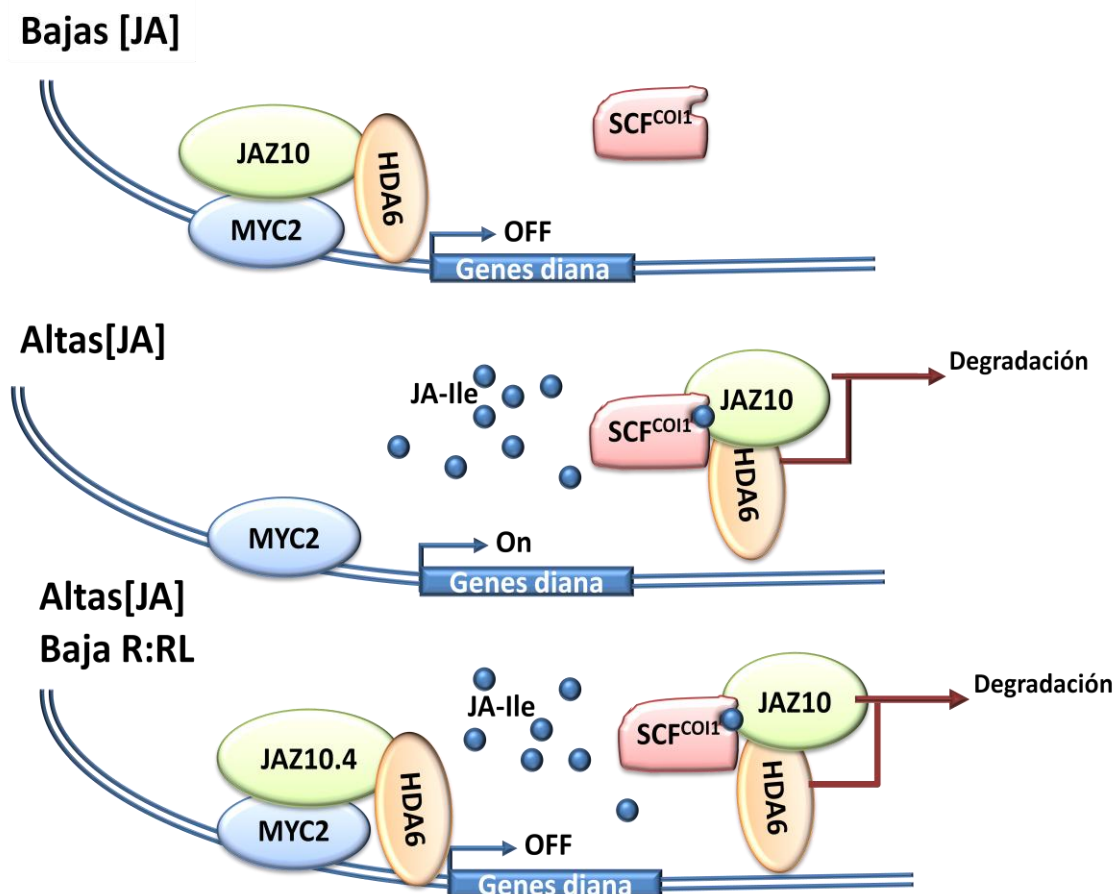


Figura 6.1: Modelo propuesto de la represión de la vía de los JAs por bajas relaciones R:RL. Bajo condiciones normales las concentraciones de JA son bajas y las respuestas de defensa se encuentran inactivadas por JAZ10 y HDA6. Bajo condiciones de estrés por ataque de patógenos o insectos herbívoros los niveles de JA-Ile aumentan e inducen la interacción de JAZ10-HDA6 con SCF^{COI1} lo que genera su posterior degradación en el proteosoma 26S. Bajo condiciones de competencia lumínica (bajas relaciones R:RL) y estrés concomitantemente al aumento en los niveles de JA-Ile aumenta la estabilidad de las proteínas JAZ10, posiblemente debido a un aumento en las proporciones de las variantes de *splicing* insensibles al JA, como JAZ10.4. Como consecuencia, las estabilización de las proteínas JAZ10 resulta en una atenuación de las respuestas activadas por el JA y un aumento en la sensibilidad a patógenos necrótrofos e insectos herbívoros.

Aún quedan numerosos experimentos por realizar para determinar la intrincada red de señales mediante las cuales el RL reprime la vía de señalización de los JAs. Entre ellos se encuentran análisis a nivel proteómico de las proteínas JAZ10 y sus variantes de *splicing*. También sería promisorio analizar mediante estudios de CHIP-PCR o CHIP-Seq la participación del estado de acetilación de la cromatina en la regulación de la vía de los JAs por tratamientos con RL. Por otro lado, sería importante esclarecer la aparente variación en el rol de las proteínas DELLA según el estado ontogénico de la planta.

Comprender estas redes de señales reviste un fuerte interés y tiene implicancias prácticas sustanciales en el campo de la agricultura. Una mejor comprensión de cómo estos mecanismos de defensa son regulados en condiciones naturales, tanto por factores de estrés abiótico como por factores bióticos, aportará elementos de valor para diseñar aproximaciones biotecnológicas destinadas a producir cultivares más resistentes y de este modo limitar los impactos ambientales del uso de agroquímicos.

CAPÍTULO 7

Bibliografía

CAPÍTULO 7

Bibliografía

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP** (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91-94
- Achard P, Renou J-P, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P** (2008) Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Current Biology* **18**: 656-660
- Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP** (2003) Ethylene Regulates Arabidopsis Development via the Modulation of DELLA Protein Growth Repressor Function. *The Plant Cell Online* **15**: 2816-2825
- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH** (1997) An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* **276**: 945-948
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K** (2004) Antagonistic Interaction between Absciscic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **16**: 3460-3479
- Bai M, Shang J, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun T, Wang Z** (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* **14**: 810-817
- Baldwin IT** (2001) An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiol* **127**: 1449 - 1458
- Ballaré CL** (1999) Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends in Plant Science* **4**: 97-102
- Ballaré CL** (2009) Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. *Plant Cell and Environment* **32**: 713-725
- Ballaré CL** (2009) Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. *Plant, Cell & Environment* **32**: 713-725

- Ballaré CL** (2011) Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Science* **16**: 249-257
- Ballaré CL** (2014) Light Regulation of Plant Defense. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 335-363
- Ballaré CL, Scopel AL, Sánchez RA** (1990) Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science* **247**: 329-332
- Barbazuk WB, Fu Y, McGinnis KM** (2008) Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: Opportunities and challenges. *Genome Research* **18**: 1382-1391
- Berr A, Ménard R, Heitz T, Shen W-H** (2012) Chromatin modification and remodelling: a regulatory landscape for the control of Arabidopsis defence responses upon pathogen attack. *Cellular Microbiology* **14**: 829-839
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R** (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* **29**: 23
- Bolle C** (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683-692
- Bonaventure G** (2012) Perception of insect feeding by plants. *Plant Biology* **14**: 872-880
- Bostock RM** (2005) Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 545-580
- Boter M, Ruíz-Rivero O, Abdeen A, Prat S** (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes & Development* **18**: 1577-1591
- Bradford M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Briggs WR, Christie JM** (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**: 204-210
- Brooks DM, Bender CL, Kunkel BN** (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **6**: 629-639
- Browse J** (2009) Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 183-205

- Burdon JJ, Chilvers GA** (1982) Host density as a factor in plant disease ecology. *Annual Review of Phytopathology* **20**: 143-166
- Cao D, Cheng H, Wu W, Soo HM, Peng J** (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**: 509-525
- Casal JJ** (2013) Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 403-427
- Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, Demkura PV, de Wit M, Patitucci MS, Pierik R, Pieterse CMJ, Ballaré CL** (2012) Low red/far-red ratios reduce *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea* and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiology* **158**: 2042-2052
- Cipollini D** (2004) Stretching the limits of plasticity: can a plant defend against both competitors and herbivores? *Ecology* **85**: 28-37
- Cipollini D** (2010) Constitutive expression of methyl jasmonate-inducible responses delays reproduction and constrains fitness responses to nutrients in *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary Ecology* **24**: 59-68
- Cipollini D, Enright S, Traw MB, Bergelson J** (2004) Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Molecular Ecology* **13**: 1643–1653
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA** (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol.* **25**: 413-427
- Consortium AIM** (2011) Evidence for Network Evolution in an *Arabidopsis* Interactome Map. *Science* **333**: 601-607
- Chandler PM, Marion-Poll A, Ellis M, Gubler F** (2002) Mutants at the Slender1 Locus of Barley cv Himalaya. Molecular and Physiological Characterization. *Plant Physiology* **129**: 181-190
- Chen LT, Luo M, Wang YY, Wu K** (2010) Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3345-3353
- Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, Cao D, Luo D, Harberd NP, Peng J** (2004) Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055-1064

- Cheng H, Song S, Xiao L, Soo HM, Cheng Z, Xie D, Peng J** (2009) Gibberellin Acts through Jasmonate to Control the Expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to Promote Stamen Filament Growth in Arabidopsis. *PLoS Genetics* **5**: e1000440
- Cheng YT, Germain H, Wiermer M, Bi D, Xu F, García AV, Wirthmueller L, Després C, Parker JE, Zhang Y, Li X** (2009) Nuclear Pore Complex Component MOS7/Nup88 Is Required for Innate Immunity and Nuclear Accumulation of Defense Regulators in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **21**: 2503-2516
- Chico J-M, Fernández-Barbero G, Chini A, Fernández-Calvo P, Díez-Díaz M, Solano R** (2014) Repression of Jasmonate-Dependent Defenses by Shade Involves Differential Regulation of Protein Stability of MYC Transcription Factors and Their JAZ Repressors in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*
- Chini A, Fonseca S, Chico JM, Fernández-Calvo P, Solano R** (2009) The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *The Plant Journal* **59**: 77-87
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671
- Chung HS, Cooke TF, Depew CL, Patel LC, Ogawa N, Kobayashi Y, Howe GA** (2010) Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *The Plant Journal* **63**: 613-622
- Chung HS, Howe GA** (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**: 131-145
- Chung HS, Niu Y, Browse J, Howe GA** (2009) Top hits in contemporary JAZ: An update on jasmonate signaling. *Phytochemistry* **70**: 1547-1559
- de Lucas M, Daviere J-M, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, Prat S** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480-484
- de Wit M, Spoel SH, Sanchez-Perez GF, Gommers CMM, Pieterse CMJ, Voesenek LACJ, Pierik R** (2013) Perception of low red:far-red ratio compromises both

salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in Arabidopsis. *The Plant Journal* **75**: 90-103

Demianski AJ, Chung KM, Kunkel BN (2012) Analysis of Arabidopsis JAZ gene expression during *Pseudomonas syringae* pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* **13**: 46-57

Demkura PV, Abdala G, Baldwin IT, Ballaré CL (2010) Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet-B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology* **152**: 1084-1095

Demole E, Lederer E, Mercier D (1962) Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* **45**: 675-685

Després C, DeLong C, Glaze S, Liu E, Fobert PR (2000) The Arabidopsis NPR1/NIM1 Protein Enhances the DNA Binding Activity of a Subgroup of the TGA Family of bZIP Transcription Factors. *The Plant Cell Online* **12**: 279-290

Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M, Turner JG (2002) COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant Journal* **32**: 457-466

Dicke M, Baldwin IT (2010) The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science* **15**: 167-175

Diezel C, Von Dahl C, Gaquerel E, Baldwin I (2009) Different lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. *Plant Physiol.* **150**: 1576

Dill A, Jung H-S, Sun T-p (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 14162-14167

Dill A, Sun T-p (2001) Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **159**: 777-785

Djakovic-Petrovic T, Wit Md, Voesenek LACJ, Pierik R (2007) DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *The Plant Journal* **51**: 117-126

Dombrecht B, Xue G, Sprague S, Kirkegaard J, Ross J (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2225

- Dong X** (2004) NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 547-552
- Durrant WE, Dong X** (2004) SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209
- El Oirdi M, Abd El Rahman T, Rigano L, El Hadrami A, Rodriguez M** (2011) Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* **23**: 2405
- Elad Y** (1991) An inhibitor of polyamine biosynthesis — Difluoromethylornithine — and the polyamine spermidine for the control of gray mold(Botrytis Cinerea). *Phytoparasitica* **19**: 201-209
- Erb M, Meldau S, Howe GA** (2012) Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science* **17**: 250-259
- Fan W, Dong X** (2002) In Vivo Interaction between NPR1 and Transcription Factor TGA2 Leads to Salicylic Acid–Mediated Gene Activation in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **14**: 1377-1389
- Felton GW, Korth KL** (2000) Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 309-314
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schafer E, Fu X, Fan L-M, Deng XW** (2008) Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475-479
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, de Jaeger G, Solano R** (2011) The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701-715
- Feussner I, Wasternack C** (2002) THE LIPOXYGENASE PATHWAY. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 275-297
- Fonseca S, Chico JM, Solano R** (2009) The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 539-547

- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R** (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**: 344-350
- Franklin KA** (2008) Shade avoidance. *New Phytologist* **179**: 930-944
- Franklin KA, Quail PH** (2010) Phytochrome functions in Arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany* **61**: 11-24
- Fu X, Harberd NP** (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740-743
- Fu ZQ, Dong X** (2013) Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 839-863
- Garcion C, Métraux J** (2006) Salicylic acid. In P Hedden, SG Thomas, eds, *Plant Hormone Signaling*. Annual Plant Reviews, Vol 24. Blackwell Press, Oxford, pp 229-257
- Genoud T, Buchala AJ, Chua N-H, traux J-PM** (2002) Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. *The Plant Journal* **31**: 87-95
- Gfeller A, Dubugnon L, Liecht iR, Farmer E** (2010) Jasmonate biochemical pathway. *Sci. Signal.* **3**
- Gilroy S, Trewavas A** (2001) Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 307-314
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205-227
- Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I, Seppanen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Soderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey K-M** (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 8595-8600
- Griebel T, Zeier J** (2008) Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in arabidopsis: Phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiology* **147**: 790-801
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z-L, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun T-p, Thomas SG** (2006) Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **18**: 3399-3414

- Grunewald W, Vanholme B, Pauwels L, Plovie E, Inzé D, Gheysen G, Goossens A** (2009) Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin, Vol 10
- He Y, Michaels SD, Amasino RM** (2003) Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in Arabidopsis. *Science* **302**: 1751-1754
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* **5**: 523-530
- Heil M, Ibarra-Laclette E, Adame-Álvarez RM, Martínez O, Ramirez-Chávez E, Molina-Torres J, Herrera-Estrella L** (2012) How Plants Sense Wounds: Damaged-Self Recognition Is Based on Plant-Derived Elicitors and Induces Octadecanoid Signaling. *PLoS One* **7**: e30537
- Heil M, Karban R** (2010) Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in Ecology and Evolution* **25**: 137-144
- Hermes DA, Mattson WJ** (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology* **67**: 283-335
- Hogenhout S, Bos J** (2011) Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 422-428
- Hong G-J, Xue X-Y, Mao Y-B, Wang L-J, Chen X-Y** (2012) Arabidopsis MYC2 Interacts with DELLA Proteins in Regulating Sesquiterpene Synthase Gene Expression. *The Plant Cell Online* **24**: 2635-2648
- Hou X, Ding L, Yu H** (2013) Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense. *Plant Cell Reports* **32**: 1067-1074
- Hou X, Hu WW, Shen L, Lee LYC, Tao Z, Han JH, Yu H** (2008) Global identification of DELLA target genes during arabidopsis flower development. *Plant Physiology* **147**: 1126-1142
- Hou X, Lee LYC, Xia K, Yen Y, Yu H** (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* **19**: 884
- Howe GA** (2010) Ubiquitin ligase-coupled receptors extend their reach to jasmonate. *Plant Physiology* **154**: 471-474
- Howe GA, Jander G** (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 41-66
- Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J** (2001) slender Rice, a Constitutive Gibberellin Response Mutant, Is Caused by a Null Mutation of the SLR1 Gene, an Ortholog

of the Height-Regulating Gene GAI/RGA/RHT/D8. *The Plant Cell Online* **13**: 999-1010

Izaguirre MM, Mazza CA, Astigueta MS, Ciarla AM, Ballaré CL (2013) No time for candy: passionfruit (*Passiflora edulis*) plants down-regulate damage-induced extra floral nectar production in response to light signals of competition. *Oecologia* **173**: 213-221

Izaguirre MM, Mazza CA, Biondini M, Baldwin IT, Ballaré CL (2006) Remote sensing of future competitors: impacts on plant defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 7170-7174

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329

Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C (2010) Light-regulated plant growth and development. *In* MCP Timmermans, ed, *Current Topics in Developmental Biology*, Vol Volume 91. Academic Press, pp 29-66

Karban R (2008) Plant behaviour and communication. *Ecology Letters* **11**: 727-739

Karban R, Baldwin I (1997) *Induced Responses to Herbivory*. Chicago: Univ. Chicago Press

Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 7100-7105

Kazan K (2006) Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends in Plant Science* **11**: 109-112

Kazan K, Manners JM (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**: 22-31

Kegge W, Weldegergis BT, Soler R, Eijk MV-V, Dicke M, Voesenek LACJ, Pierik R (2013) Canopy light cues affect emission of constitutive and methyl jasmonate-induced volatile organic compounds in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **200**: 861-874

Keinänen M, Oldham NJ, Baldwin IT (2001) Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 3553-3558

Keller MM, Jaillais Y, Pedmale UV, Moreno JE, Chory J, Ballaré CL (2011) Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in *Arabidopsis* via partially-independent hormonal cascades. *The Plant Journal* **67**: 195-207

- Kessler A, Baldwin IT** (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Reviews Plant Biology*- **53**: 299-328
- Keuskamp DH, Sasidharan R, Pierik R** (2010) Physiological regulation and functional significance of shade avoidance responses to neighbors. *Plant Signaling and Behavior* **5**: 1-8
- Keuskamp DH, Sasidharan R, Vos I, Peeters AJM, Voeseek LACJ, Pierik R** (2011) Blue light-mediated shade avoidance requires combined auxin and brassinosteroid action in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **67**: 208-217
- Khorasanizadeh S** (2004) The Nucleosome. *Cell* **116**: 259-272
- Kombrink E** (2012) Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* **236**: 1351-1366
- Koo AJ, Howe GA** (2012) Catabolism and Deactivation of the Lipid-derived Hormone Jasmonoyl-isoleucine. *Frontiers in Plant Science* **3**
- Koo AJK, Gao XL, Jones AD, Howe GA** (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **59**: 974-986
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ** (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology* **147**: 1358-1368
- Koornneef A, Pieterse CMJ** (2008) Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* **146**: 839-844
- Kornberg R** (1974) Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**: 868-871
- Kornberg R, Thomas J** (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* **184**: 865-868
- Kourtchenko O, Andersson MX, Hamberg M, Brunnström Å, Göbel C, McPhail KL, Gerwick WH, Feussner I, Ellerström M** (2007) Oxo-Phytodienoic Acid-Containing Galactolipids in *Arabidopsis*: Jasmonate Signaling Dependence. *Plant Physiology* **145**: 1658-1669
- Kouzarides T** (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**: 693-705
- Kramell R, Schmidt J, Herrmann G, Schliemann W** (2005) N-(Jasmonoyl)tyrosine-Derived Compounds from Flowers of Broad Beans (*Vicia faba*). *Journal of Natural Products* **68**: 1345-1349

- Kunkel BN, Brooks DM** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325-331
- Kurepin L, Walton L, Reid D, Chinnappa C** (2010) Light regulation of endogenous salicylic acid levels in hypocotyls of *Helianthus annuus* seedlings. *Botany* **88**: 668
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J** (2002) Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development* **16**: 646-658
- Leon-Reyes A, Spoel SH, De Lange ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RAM, Ritsema T, Pieterse CMJ** (2009) Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiology* **149**: 1797-1809
- Leone M, Keller M, Cerrudo I, Ballare CL** (2014) To grow or defend? Low red:far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in Arabidopsis seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytologist*. doi: **10.1111/nph.12971**
- Li X, Zhang Y, Clarke JD, Li Y, Dong X** (1999) Identification and Cloning of a Negative Regulator of Systemic Acquired Resistance, SNI1, through a Screen for Suppressors of npr1-1. *Cell* **98**: 329-339
- Lorenzo O, Chico J, Sanchez-Serrano J, Solano R** (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1938
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell* **15**: 165–178
- Lorenzo O, Solano R** (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 532-540
- Mathews S, Sharrock RA** (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell & Environment* **20**: 666-671

- McGrath K, Dombrecht B, Manners J, Schenk P, Edgar C** (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiol.* **139**: 949
- McGuire R, Agrawal AA** (2005) Trade-offs between the shade-avoidance response and plant resistance to herbivores? Tests with mutant *Cucumis sativus*. *Functional Ecology* **19**: 1025-1031
- Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J, Howe GA, He SY** (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *The Plant Journal* **55**: 979-988
- Metlen KL, Aschehoug ET, Callaway RM** (2009) Plant behavioural ecology: Dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant, Cell and Environment* **32**: 641-653
- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* **177**: 114-127
- Mishina TE, Zeier J** (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal* **50**: 500-513
- Monaghan J, Germain H, Weihmann T, Li X** (2010) Dissecting plant defence signal transduction: modifiers of *snc1* in Arabidopsis. *Can. J. Plant Pathol.* **32**: 35
- Moore JW, Loake GJ, Spoel SH** (2011) Transcription Dynamics in Plant Immunity. *The Plant Cell Online* **23**: 2809-2820
- Moreno JE, Tao Y, Chory J, Ballaré CL** (2009) Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 4935-4940
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I** (2009) Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 511-517
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459-463

- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP, Jones JDG** (2008) DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology* **18**: 650-655
- Nawrath C, Métraux JP** (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell* **11**: 1393-1404
- Newman M-A, Dow JM, Molinaro A, Parrilli M** (2007) Invited review: Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin Research* **13**: 69-84
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591-1604
- Olszewski N, Sun T-p, Gubler F** (2002) Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *The Plant Cell Online* **14**: S61-S80
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ** (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics* **40**: 1413-1415
- Panstruga R, Parker JE, Schulze-Lefert P** (2009) SnapShot: Plant Immune Response Pathways. *Cell* **136**: 978.e971-978.e973
- Pape S, Thurow C, Gatz C** (2010) The *Arabidopsis* PR-1 Promoter Contains Multiple Integration Sites for the Coactivator NPR1 and the Repressor SNI1. *Plant Physiology* **154**: 1805-1818
- Park J-H, Halitschke R, Kim HB, Baldwin IT, Feldmann KA, Feyereisen R** (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal* **31**: 1-12
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tillemans S, Grunewald W, Pérez AC, Chico JM, Bossche RV, Sewell J, Gil E, García-Casado G, Witters E, Inzé D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A** (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788-791
- Pauwels L, Goossens A** (2011) The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell* **23**: 3089-3100
- Payankaulam S, Li LM, Arnosti DN** (2010) Transcriptional repression: Conserved and evolved features. *Current Biology* **20**: R764-R771

- Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Métraux J-P, Broekaert WF** (1998) Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **10**: 2103-2113
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**: 308-316
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM** (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489-521
- Pozo M, Van der ES, Van Loon L, Pieterse C** (2008) Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* **180**: 511
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C** (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 393-398
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CMJ, Memelink J** (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* **147**: 1347-1357
- Preston CA, Lewandowski C, Enyedi AJ, Baldwin IT** (1999) Tobacco mosaic virus inoculation inhibits wound-induced jasmonic acid-mediated responses within but not between plants. *Planta* **209**: 87-95
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN** (1999) The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal* **18**: 111-119
- Qiao H, Chang KN, Yazaki J, Ecker JR** (2009) Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. *Genes & Development* **23**: 512-521
- Quidde T, Büttner P, Tudzynski P** (1999) Evidence for Three Different Specific Saponin-detoxifying Activities in Botrytis cinerea and Cloning and Functional Analysis of a Gene Coding for a Putative Avenacinase. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 273-283
- Rabino I, Mancinelli A** (1986) Light, Temperature, and Anthocyanin Production. *Plant Physiology* **81**: 922-924

- Rayapuram C, Baldwin IT** (2007) Increased SA in NPR1-silenced plants antagonizes JA and JA-dependent direct and indirect defenses in herbivore-attacked *Nicotiana attenuata* in nature. *The Plant Journal* **52**: 700-715
- Reddy ASN** (2007) Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *In*, Vol 58, pp 267-294
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R** (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* **332**: 103-106
- Rockwell NC, Lagarias JC** (2006) The Structure of Phytochrome: A Picture Is Worth a Thousand Spectra. *The Plant Cell Online* **18**: 4-14
- Roudier F, Ahmed I, Bérard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, Giraut L, Després B, Drevensek S, Barneche F, Dèrozier S, Brunaud V, Aubourg S, Schnittger A, Bowler C, Martin-Magniette ML, Robin S, Caboche M, Colot V** (2011) Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis, Vol 30
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ** (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**: 247-258
- Schaller A, Stintzi A** (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**: 1532-1538
- Schmitt J, Stinchcombe JR, Shane Heschel M, Huber H** (2003) The Adaptive Evolution of Plasticity: Phytochrome-Mediated Shade Avoidance Responses. *Integrative and Comparative Biology* **43**: 459-469
- Schoonhoven LM, Loon JJA, Dicke M** (2005) *Insect-plant biology*, Ed 2nd. Oxford University Press, Oxford ; New York
- Schulze-Lefert P, Panstruga R** (2011) A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science* **16**: 117-125
- Schwessinger B, Ronald PC** (2012) Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 451-482
- Sellaro R, Crepy M, Trupkin SA, Karayekov E, Buchovsky AS, Rossi C, Casal JJ** (2010) Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **154**: 401-409

- Shan X, Yan J, Xie D** (2012) Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 84-91
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N** (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400-407
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M** (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**: 520-523
- Shyu C, Figueroa P, DePew CL, Cooke TF, Sheard LB, Moreno JE, Katsir L, Zheng N, Browse J, Howe GA** (2012) JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*: in press
- Smith H** (1995) Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 289-315
- Smith H** (2000) Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature* **407**: 585-596
- Song J, Durrant WE, Wang S, Yan S, Tan EH, Dong X** (2011) DNA Repair Proteins Are Directly Involved in Regulation of Gene Expression during Plant Immune Response. *Cell Host & Microbe* **9**: 115-124
- Spoel SH, Dong X** (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host and Microbe* **3**: 348-351
- Spoel SH, Dong X** (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol* **12**: 89-100
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X** (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18842-18847
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelijs JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux J-P, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CMJ** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760-770

- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X** (2009) Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell* **137**: 860-872
- Staswick P** (2009) Plant hormone conjugation: A signal decision. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 757-759
- Staswick P, Tiriyaki I** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2117
- Staswick PE** (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends in Plant Science* **13**: 66-71
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**: 895-911
- Stotz HU, Koch T, Biedermann A, Weniger K, Boland W, Mitchell-Olds T** (2002) Evidence for regulation of resistance in Arabidopsis to egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. *Planta* **214**: 648-652
- Sultan SE** (2000) Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* **5**: 537-542
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008) Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* **321**: 952-956
- Taiz L, Zeiger E** (2002) *Plant Physiology*. In 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc
- Tanaka M, Kikuchi A, Kamada H** (2008) The arabidopsis histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiology* **146**: 149-161
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**: 164-176
- Tessadori F, Van Zanten M, Pavlova P, Clifton R, Pontvianne F, Snoek LB, Millenaar FF, Schulkes RK, Van Driel R, Voesenek LACJ, Spillane C, Pikaard CS, Fransz P, Peeters AJM** (2009) PHYTOCHROME B and HISTONE DEACETYLASE 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **5**
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK** (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**: 260-270

- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665
- Thomma BPHJ, Penninckx IAMA, Broekaert WF, Cammue BPA** (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology* **13**: 63-68
- Tretner C, Huth U, Hause B** (2008) Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2847-2856
- Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J, Katagiri F** (2009) Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet.* **5**: e1000772
- Tu S-L, Lagarias JC** (2005) The Phytochromes. *In Handbook of Photosensory Receptors*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 121-149
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL** (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 955-965
- Van der Does D, Leon-Reyes A, Koornneef A, Van Verk MC, Rodenburg N, Pauwels L, Goossens A, Körbes AP, Memelink J, Ritsema T, Van Wees SCM, Pieterse CMJ** (2013) Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCOI1-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *The Plant Cell Online* **25**: 744-761
- Van der Ent S, Van Hulten M, Pozo M, Czechowski T, Udvardi IM** (2009) Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and β -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytol.* **183**: 419
- van der Fits L, Memelink J** (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**: 295-297
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ** (1998) SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 453-483
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135-162

- Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, Kohchi T, Gheysen G** (2007) The tify family previously known as ZIM. *Trends in Plant Science* **12**: 239-244
- Verhage A, van Wees SCM, Pieterse CMJ** (2010) Plant Immunity: It's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiology* **154**: 536-540
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF** (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177-206
- von Malek B, van der Graaff E, Schneitz K, Keller B** (2002) The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**: 187-192
- Wager A, Browse J** (2012) Social Network: JAZ Protein Interactions Expand Our Knowledge of Jasmonate Signaling. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1-11
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X** (2006) A Genomic Approach to Identify Regulatory Nodes in the Transcriptional Network of Systemic Acquired Resistance in Plants. *PLoS Pathog* **2**: e123
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell Online* **14**: S131-S151
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann Bot* **100**: 681-697
- Wasternack C, Kombrink E** (2009) Jasmonates: Structural Requirements for Lipid-Derived Signals Active in Plant Stress Responses and Development. *ACS Chemical Biology* **5**: 63-77
- Weech M, Chapleau M, Pan L, Ide C, Bede J** (2008) Caterpillar saliva interferes with induced Arabidopsis thaliana defence responses via the systemic acquired resistance pathway. *J. Exp. Bot.* **59**: 2437
- Weigel RR, Pfitzner UM, Gatz C** (2005) Interaction of NIMIN1 with NPR1 Modulates PR Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **17**: 1279-1291
- Wen C-K, Chang C** (2002) Arabidopsis RGL1 Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Responses. *The Plant Cell Online* **14**: 87-100
- Wild M, Davière J-M, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P, Achard P** (2012) The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 Is a

Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses. The Plant Cell Online **24**: 3307-3319

Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature **414**: 562-565

Wu J, Baldwin IT (2010) New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. Annual Review of Genetics **44**: 1-24

Wu K, Zhang L, Zhou C, Yu CW, Chaikam V (2008) HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **59**: 225-234

Xie D-X, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG (1998) COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. Science **280**: 1091-1094

Xu CR, Liu C, Wang YL, Li LC, Chen WQ, Xu ZH, Bai SN (2005) Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the Arabidopsis root epidermis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**: 14469-14474

Yamaguchi S (2006) Gibberellin Biosynthesis in Arabidopsis. Phytochemistry Reviews **5**: 39-47

Yan JB, Zhang C, Gu M, Bai ZY, Zhang WG, Qi TC, Cheng ZW, Peng W, Luo HB, Nan FJ, Wang Z, Xie DX (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. The Plant Cell **21**: 2220-2236

Yan Y, Stolz S, Chetelat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. The Plant Cell **19**: 2470-2483

Yang D-L, Yao J, Mei C-S, Tong X-H, Zeng L-J, Li Q, Xiao L-T, Sun T-p, Li J, Deng X-W, Lee CM, Thomashow MF, Yang Y, He Z, He SY (2012) Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. Proceedings of the National Academy of Sciences **109**: E1192–E1200

Yang T, Davies PJ, Reid JB (1996) Genetic Dissection of the Relative Roles of Auxin and Gibberellin in the Regulation of Stem Elongation in Intact Light-Grown Peas. Plant Physiology **110**: 1029-1034

- Yoshinaga N, Alborn H, Nakanishi T, Suckling D, Nishida R, Tumlinson J, Mori N** (2010) Fatty Acid-amino Acid Conjugates Diversification in Lepidopteran Caterpillars. *Journal of Chemical Ecology* **36**: 319-325
- Yu H, Ito T, Zhao Y, Peng J, Kumar P, Meyerowitz EM** (2004) Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7827-7832
- Zarate S, Kempema L, Walling L** (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiol.* **143**: 866
- Zarei A, Körbes A, Younessi P, Montiel G, Champion A, Memelink J** (2011) Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **75**: 321-331
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP** (2007) Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037-3057
- Zhang X, Bernatavichute Y, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen S** (2009) Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in Arabidopsis thaliana. *Genome Biology* **10**: R62
- Zhang X, Germann S, Blus BJ, Khorasanizadeh S, Gaudin V, Jacobsen SE** (2007) The Arabidopsis LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 869- 871
- Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway RC, Conaway JW, Harper JW, Pavletich NP** (2002) Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**: 703-709
- Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B, Wu K** (2005) Histone Deacetylase19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 1196-1204
- Zhu J, Jae CJ, Zhu Y, Sokolchik I, Miyazaki S, Zhu JK, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Shi H, Yun DJ, Bressan RA** (2008) Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 4945-4950

- Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, A M, Jiang Z, Kim JM, To TK, Li W, Zhang X, Yu Q, Dong Z, Chen WQ, Seki M, Zhou JM, Guo H** (2011) Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**: 12539-12544
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai M, Wasternack C** (2000) Molecular Cloning of Allene Oxide Cyclase: THE ENZYME ESTABLISHING THE STEREOCHEMISTRY OF OCTADECANOIDS AND JASMONATES. Journal of Biological Chemistry **275**: 19132-19138
- Zipfel C** (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. Current Opinion in Plant Biology **12**: 414-420